

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»**

Факультет біотехнології і біотехніки

Кафедра промислової біотехнології

До захисту допущено:

Завідувач кафедри

_____ Тетяна ТОДОСІЙЧУК

«___» _____ 2020 р.

Дипломний проєкт

на здобуття ступеня бакалавра

за освітньо-професійною програмою «Промислова біотехнологія»

спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

**на тему: «Технологія виробництва біомаси грибів *Trametes pubescens*.
Дільниця біосинтезу»**

Виконала :

студентка IV курсу, групи БТ-62

Макогін Ольга Олександрівна _____

Керівник:

старший викладач кафедри промислової біотехнології, к.т.н.,

Тітова Лариса Олександрівна _____

Консультант з Розділу 5. Розрахунок обладнання для проведення
технологічного процесу:

старший викладач кафедри біотехніки та інженерії, к.т.н.,

Фесенко Сергій Вікторович _____

Рецензент:

доцент кафедри екобіотехнології та біоенергетики, к.т.н.,

Козар Марина Юріївна _____

Засвідчую, що у цьому дипломному
проєкті немає запозичень з праць інших
авторів без відповідних посилань.

Студентка _____

Київ – 2020 року

ВІДОМІСТЬ ДИПЛОМНОГО ПРОЄКТУ

№ з/п	Формат	Позначення	Найменування	Кількість листів	Примітка
1	A4		Завдання на дипломний проєкт	2	
2	A4	ДП 6210. 00.000 ПЗ	Пояснювальна записка	86	
3	A1	ДП 6210. 01.000 ТК	Технологічна схема	1	
4	A1	ДП 6210. 02.000 ТК	Апаратурна схема	1	
5	A1	ДП 6210. 03.000 ТК	Ферментер	1	

				ДП 6210 00.000.00		
	ПБ	Підп.	Дата	Відомість дипломного проєкту	Лист	Листів
Розробн.	Макогін О.О.				1	1
Керівн.	Тітова Л.О.				КПІ ім. Ігоря Сікорського Каф. ПБТ Гр. БТ-62	
Консульт.						
Н/контр.						
Зав.каф.	Тодосійчук Т.С.					

Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра промислової біотехнології

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Промислова біотехнологія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

_____ Тетяна ТОДОСІЙЧУК

«_27_» лютого 2020 р.

ЗАВДАННЯ

на дипломний проєкт студенту

Макогін Ользі Олександрівні

1. Тема проєкту «Технологія виробництва біомаси грибів *Trametes pubescens*. Дільниця біосинтезу», керівник проєкту Тітова Лариса Олександрівна, к.т.н., затверджені наказом по університету від «21» травня 2020 р. № 1125-с

2. Термін подання студентом проєкту _____

3. Вихідні дані до проєкту: штам *Trametes pubescens* 923-2 з продуктивністю 7-8 г/дм³; ферментер для виробничого культивування - об'єм 10 м³; параметри культивування: $t = 27 \pm 1$ °C, аерація, $\tau = 40$ год; кінцевий продукт – субстанція сухої міцеліальної біомаси гриба.

4. Зміст пояснювальної записки: підібрати і охарактеризувати продуцент для виробництва міцеліальної біомаси; провести аналіз методів створення високопродуктивних промислових продуцентів, обґрунтувати схему отримання продуценту, що використовується у проєкті; визначити основні фізико-хімічні характеристики кінцевого продукту та біохімічні основи його виробництва; скласти матеріальний баланс виробництва міцеліальної біомаси, запропонувати технологічну і апаратурну схеми; обґрунтувати

вибір конструкції ферментеру для виробничого культивування та здійснити розрахунок для нього.

5. Перелік графічного матеріалу (із зазначенням обов'язкових креслеників, плакатів, презентацій тощо): креслення загального виду ферментеру – 1 арк. А1, технологічна схема – 1 арк. А1, апаратурна схема – 1 арк. А1

6. Консультанти розділів проекту

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 5	Фесенко С.В., ст. викл. каф. біотехніки та інженерії		

7. Дата видачі завдання _____

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання дипломного проекту	Термін виконання етапів проекту	Примітка
1.	Аналіз інформації джерел фахової літератури за темою дипломного проекту	02.03.20-02.04.20	
2.	Вступ	23.03.20-12.04.20	
3.	Характеристика біологічного агента	23.03.20-15.04.20	
4.	Технологічна схема. Підрозділи 4.3-4.4	30.03.20-17.04.20	
5.	Біохімічні основи виробництва	02.04.20-23.04.20	
6.	Технологічна частина. Підрозділи 4.1-4.4	30.03.20-30.04.20	
7.	Складання апаратурної схеми	02.04.20-19.04.20	
8.	Методи отримання промислових продуцентів. Блок-схема	23.04.20-02.05.20	
9.	Технологічна частина. Підрозділ 4.5, висновки	12.04.20-25.05.20	
10.	Розрахунок обладнання для проведення технологічного процесу	12.04.20-22.05.20	
11.	Заповнення титулів, завдання	20.05.20-28.05.20	
12.	Реферати двома мовами	20.05.20-28.05.20	
13.	Оформлення списку використаної літератури	20.05.20-04.06.20	
14.	Оформлення пояснювальної записки. Подання готового диплому секретареві ЕК	20.05.20-08.06.20	

Студент

Ольга МАКОГІН

Керівник

Лариса ТІТОВА

**Пояснювальна записка
до дипломного проєкту
на тему: «Технологія виробництва біомаси грибів
Trametes pubescens. Дільниця біосинтезу»**

Київ – 2020 року

РЕФЕРАТ

Дипломний проект : 86с., 7 рис., 7 табл., 68 посилань.

Дипломний проект присвячений технології виробництва біомаси гриба *Trametes pubescens*. Біомаса гриба *T. pubescens*, отримана методом глибинного культивування, характеризується широким спектром біологічної активності, що виявляється в імуномодулюючій, гепатопротекторній та онкостатичній функціях. Кінцевий продукт даної технології може використовуватися як основа (субстанція) у виробництві функціональних харчових продуктів на основі біомаси гриба *T. pubescens*, наприклад, у формі таблеток або капсул.

У якості продуцента було обрано штам *Trametes pubescens* 923-2, що характеризується високими показниками росту на комплексному середовищі і вмістом β -глюканів, з якими пов'язані імуномодулюючі властивості. Було проаналізовано морфологічні, культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки продуцента.

На основі літературних даних для виробництва цільового продукту в заданій формі випуску було обрано технологічну схему та відповідно до неї складено апаратурну схему.

Для дільниці біосинтезу використано апаратурне оснащення, представлене ферментером об'ємом 10 м³ та коефіцієнтом заповнення 0,7. Апарат оснащений турбінною мішалкою та барботером, для яких наведено відповідні розрахунки.

TRAMETES PUBESCENS, БАЗИДІЄВІ ГРИБИ, БІОМАСА ГРИБА,
ВИРОБНИЧЕ КУЛЬТИВУВАННЯ, ФЕРМЕНТЕР, ФУНКЦІОНАЛЬНІ
ХАРЧОВІ ПРОДУКТИ

					ДП 6210. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РЕФЕРАТ	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розробив		Макогін О.О.				Д	5	86
Консульт.						КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
Керівник		Тітова Л.О.						
Затвер.								

ABSTRACT

Diploma project : 86 pages, 7 pictures, 7 tables, 68 links.

The diploma project is devoted to the technology of biomass production of the fungus *Trametes pubescens*. The biomass of the fungus *T. pubescens*, obtained by the method of deep cultivation, is characterized by a wide range of biological activity, which is manifested in immunomodulatory, hepatoprotective and oncostatic functions. The final product of this technology can be used as a basis (substance) in the production of functional foods based on the biomass of the fungus *T. pubescens*, for example, in the form of tablets or capsules.

The producer was *Trametes pubescens* 923-2, which is characterized by high growth rates on a complex environment and the content of β -glucans, which are associated with immunomodulatory properties. The morphological, cultural and physiological and biochemical characteristics of the producer were analyzed.

Based on the literature data for the production of the target product in a given form of production, a technological scheme was selected and a hardware scheme was drawn up accordingly.

For the biosynthesis section, the equipment equipped with a fermenter with a volume of 10 m³ and a filling factor of 0.7 was used. The device is equipped with a turbine stirrer and bubbler, for which the appropriate calculations are given.

TRAMETES PUBESCENS, BASIDIUM FUNGI, FUNGAL BIOMASS,
PRODUCTION CULTIVATION, FERMENTER, FUNCTIONAL FOOD

					ДП 6210. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив		Макогін О.О.			ABSTRACT	Стадія	Аркуш	Аркушів
Консульт.						Д	6	86
Керівник		Тітова Л.О.				КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
Затвер.								

ЗМІСТ

ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	12
1.1 Основні промислові продуценти	12
1.2 Систематичне положення.....	15
1.3 Морфолого-цитологічні ознаки	15
1.4 Культуральні ознаки.....	17
1.5 Фізіолого-біохімічні ознаки.....	18
1.6 Поширення в природі.....	21
РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА.....	23
2.1 Характеристика кінцевого продукту.....	23
2.2 Схема біохімічних перетворень.....	26
2.3 Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології.....	28
2.4 Методи очистки цільового продукту.....	29
2.5 Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси.....	29
РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ....	33
3.1 Генетична вивченість біологічного об'єкта.....	33
3.2 Загальні методи створення високопродуктивних промислових штамів.....	34
3.2.1 Використання природного та штучного добору.....	34
3.2.2 Використання індукованого мутагенезу.....	36
3.2.3 Використання гібридизації для створення промислових продуцентів біологічно активних речовин.....	37
3.3 Схема отримання продуцентів, що використовуються в роботі.....	38

					ДП 6210. 00. 000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробив		Макогін О.О.			ЗМІСТ	Стадія	Аркуш
Консульт.						Д	7
							86
Керівник		Тітова Л.О.				КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ	
Затвер.							

РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА.....	41
4.1 Характеристика кінцевої продукції виробництва.....	41
4.2 Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві... ..	43
4.3 Опис технологічного процесу.....	45
4.4 Матеріальний баланс.....	56
4.5 Контроль виробництва.....	57
РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ.....	61
5.1 Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату.....	61
5.2 Технологічні, конструктивні розрахунки.....	63
5.3 Вибір загальнозаводського обладнання.....	73
5.4 Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища.....	74
ВИСНОВКИ.....	77
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	79

ВСТУП

На даний час одним із основних питань є проблема стану здоров'я населення та шляхи її вирішення. Одним із основних способів збереження стану здоров'я є забезпечення повноцінного збалансованого харчування, що має на меті створення функціональних харчових продуктів, лікувально-профілактичних, а також лікарських засобів на основі сировини рослинного походження [1]. Джерелом такої сировини можуть виступати базидієві гриби, для яких достатньо добре освоєні процеси промислового культивування, що пов'язано з позитивною тенденцією до створення нових препаратів на їх основі протягом останніх років. Близько 700 видів базидієвих грибів володіють широким спектром лікувальних властивостей, зокрема імуномодулювальними, онкостатичними, радіопротекторними, антибактеріальними, гепатопротекторними, протизапальними та іншими [2].

Розвиток біотехнології створює більш досконалі умови для культивування грибів. Установлено, що біологічно активні речовини, виділені із глибинного міцелію та культуральної рідини за спектром дії не поступаються, а іноді навіть переважають сполуки, що отримують із плодових тіл. Окрім цього, глибинне культивування дозволяє інтенсифікувати процес отримання цільового продукту за рахунок синтезу цільових речовин, підвищення продуктивності штамів та отримання продуктів із заданими властивостями [1,3].

До добре вивчених базидієвих грибів належать представники роду *Trametes*, що включає в себе багато видів, запатентованих у якості продуцентів онкостатичних речовин, особливо на території Японії та країн Далекого Сходу. Їх використання зумовлене наявністю полісахаридів, що на відміну від мікробних, мають підвищену протипухлинну дію. Окрім цього,

					ДП 6210. 00. 000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробив		Макогін О.О.			ВСТУП	Стадія	Аркуш
Консульт.						Д	9
						86	
Керівник		Тітова Л.О.				КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ	
Затвер.							

представники роду *Trametes* характеризуються високими показниками росту, відсутністю токсичності та біологічною активністю, що є перспективним для розробки нових препаратів на основі міцеліальної біомаси [3].

На території України на даний час виготовляють такі препарати як «Мікотон» та «Міпровіт» на основі міцеліальної маси ксилотрофних грибів *Fomes fomentarius* та *Trametes hirsuta* до складу яких входять хітин, глюкани та меланіни. Препарат на основі *Trametes pubescens* в Україні не зареєстрований, проте на території Росії з нього виготовляють біологічно активну добавку, що має виражену імуномодулюючу активність, онкостатичну та гепатопротекторну дію [1,4]. Даний продуцент характеризується високою швидкістю росту при глибинному культивуванні із високими показниками накопичення біомаси на середовищах з м'ясою, що забезпечує економічність процесу та визначає перспективність впровадження даного продуценту у промислове виробництво.

Актуальність виробництва препарату на основі біомаси гриба *T. pubescens* зумовлена широким спектром її лікувальних властивостей, а також є безпечною для використання людиною. Субстанція включає у своєму складі полісахариди, речовини білкової та ліпідної природи, а також вітаміни й мінеральні речовини, що зумовлюють її функції. Отримана біомаса може бути використана як основа для виробництва функціональних харчових продуктів. В Україні на даний час не відбувається виробництва даного продукту з використанням *T. pubescens*, тому отримання біомаси *T. pubescens* шляхом глибинного культивування є актуальним.

Метою даного дипломного проекту було вдосконалення ділянки біосинтезу технології виробництва біомаси грибів *T. pubescens*.

Для досягнення мети було поставлено наступні **завдання**:

1. Проаналізувати властивості штамів *T. pubescens*, на основі досліджень наведених в літературі, та обрати найбільш продуктивний.
2. Запропонувати раціональний склад поживного середовища із врахуванням фізіолого-біохімічних характеристик обраного штаму.

					ДП 6210. 00. 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		10

3. Проаналізувати методи отримання промислового високопродуктивного штаму *Trametes pubescens*.

4. Обґрунтувати вибір технології виробництва цільового продукту та на її основі запропонувати технологічну та апаратурну схеми.

5. Скласти матеріальний баланс виробництва міцеліальної біомаси для однієї серії готової продукції.

6. Виконати розрахунки для виробничого ферментера, який задовольнятиме умови культивування обраного штаму.

					ДП 6210. 00. 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		11

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

1.1. Основні промислові продуценти

Дереворуйнівні базидіоміцети (ксилотрофи) все частіше стають об'єктами досліджень, що визначається унікальними екосистемними функціями та фізіолого-біохімічними властивостями грибів цієї групи. Вищі базидієві гриби у природі здійснюють процес деструкції таких складних біополімерів як целюлоза, геміцелюлоза, лігнін, пектинові речовини. Особливого значення у межах групи ксилотрофів надають грибам білої гнилі, що володіють спектром лігнолітичних ферментів [1]. Така трофічна приуроченість до лігніновмісних субстратів надає їм здатності до утилізації різноманітних сільськогосподарських та промислових відходів, що створює перспективи для культивування лігнотрофних базидіоміцетів [2].

Однак на даний час усе більше уваги приділяється розробці нових лікарських препаратів із природної сировини, у даному випадку – із грибів. Вищі гриби, а саме базидіоміцети, являють собою перспективну сировину по відношенню до отримання із них лікарських препаратів та біологічно активних добавок (БАДів). Особливою різноманітністю фармакологічної дії відрізняються ксилотрофні базидіоміцети. Вони володіють антимікробними, адаптогенними, імуностимулюючими та іншими важливими властивостями, і використовуються в якості гіпотензивних, капіляророзміцнюючих, протизвєнних, протиракових та інших засобів [3,4].

Широко розповсюдженою у природі групою ксилотрофних базидієвих грибів є траметоїдні трутовики. У відношенні фармакології добре вивченим є ряд представників грибів роду *Trametes* [5].

					ДП 6210. 00. 000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробив	Макогін О.О.				РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	Стадія	Аркуш
Консульт.						Д	12
						Аркушів	
						86	
Керівник	Тимова Л.О.					КПІ ім. Ігоря Сікорського	
Затвер.						ФБТ	

Рід *Trametes* включає велику кількість видів, що запатентовані як продуценти онкостатичних речовин, серед яких *Trametes pubescens*, *Trametes consors*, *Trametes conchifer*, *Trametes biformis*, *Trametes hirsuta* та *Trametes versicolor*, що поширені у флорі України [6].

Якщо говорити про конкретних представників, то *T. hirsuta* відомий лікувальними властивостями при хворобах легенів, кашлі, використовується для зняття жару, а також для здійснення прискореної регенерації тканин м'язів [7]. Також цей ксилотрофний гриб має здатність до синтезу комплексу фізіологічно-активних сполук із високим антиоксидантним статусом, що визначається наявністю фенольних сполук [6].

Серед вище згаданих продуцентів, одним із найбільш описаних та досліджених є *T. versicolor*, що використовується японською біотехнологічною компанією «Sankyo Co Ltd.». У народній медицині Китаю *T. versicolor* відомий під назвою Yunzhi, у Японії – Kawaratake. Крестин, або PSK, що є результатом досліджень японської фірми “Kureha Kagaku Koguo K.K.”, його південнокорейський аналог Coriolan, китайський аналог IPPV та інші препарати застосовуються при лікуванні злоякісних утворень ШКТ, та найчастіше в поєднанні з хіміо- або радіотерапією, а також зі звичайною та кріохірургією у післяопераційний період, а також в якості підтримуючої терапії [6]. Препарати ефективні в пероральній формі, є малотоксичними та придатними для тривалого застосування. Компанією MRL було розроблено біологічно-активну добавку Coriolus-MRL, яка на відміну від крестину, не є екстрактом, а містить міцелій та примордії гриба [8]. У харчовій промисловості *T. versicolor* може бути застосованим завдяки його антимікробним властивостям [9]. Також є дані про перспективність використання в *C. versicolor*, *C. hirsuta*, *C. zonatus* у текстильному та шкіряному виробництвах [6].

Лікарський гриб-трутовик *T. pubescens*, за літературними даними, володіє протипухлинними та імунізуючими властивостями, що за своєю

					ДП 6210. 00. 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		13

ефективністю переважають високоочищений препарат *T. versicolor* – PSK [10].

Згідно з даними, представленими в дослідженнях [10,11], для цього гриба показана достатньо висока антимікробна та лікувально-профілактична ефективність препаратів на його основі [12]. Зокрема, штам *T. pubescens* 0663 був відібраний як такий, що володіє високими антимікробними характеристиками, а на його основі було створено препарат Леван-1, що рекомендовано використовувати у виробництві пресованих дріжджів на стадії підготовки м'ясового сусла, та ветеринарний препарат Леван-2, який призначений для лікування і профілактики шлунково-кишкових захворювань бактеріальної етіології новонароджених телят. Препарат володіє антимікробною активністю по відношенню до референтних штамів мікроорганізмів родів *Salmonella*, *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, а також штамів виділених від хворих тварин [13,6].

На сьогоднішній день, особливу увагу приділяють новому ветеринарному препарату Траметину, прототипом якого є Леван-2. Культивування для виробництва Траметину проводять із додаванням до середовища сірчанокислового цинку та селенистокислового натрію. Отриманий препарат володіє високою антиоксидантною активністю та містить у своєму складі більше 80 компонентів, серед яких органічні кислоти та їх ефіри, альдегіди, спирти, терпени, а також такі мікроелементи як селен і цинк [14].

Інші дослідження були направлені на розробку і вивчення біологічних властивостей препарату на основі сухої міцеліальної субстанції *T. pubescens*. У результаті проведених досліджень було отримано продукт із високою біологічною активністю, а також позитивним впливом на клітинний імунітет організму, зокрема, співвідношення Т- і В-лімфоцитів [12]. Основою отриманого продукту, що на даний час зареєстрований як біологічно активна добавка, є суха біомаса *T. pubescens* 923-2, для якої доведена безпечність, клінічна ефективність та висока біологічна цінність [15]. Пероральне

					ДП 6210. 00. 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		14

застосування препарату сприяє зниженню рівня накопичення пухлинно-асоційованих антигенів – феритину, карбогідратного та мусциноподібного антигену. Вживання препарату протягом визначеного курсу сприяє відновленню дезінтоксикаційних властивостей печінки (відновлення оксидаз-змішаної функції печінки до фізіологічної норми) [6].

1.2. Систематичне положення

Обраний продуцент *T. pubescens*, раніше відомий як *Coriolus pubescens* відповідно до «Визначника грибів України» належав до порядку *Aphyllorphorales*, родини *Polyporaceae*, підродини *Corioloideae*, роду *Coriolus* [16]. Синонімічними назвами є *Boletus pubescens*, *Coriolus pubescens*, *Polyporys pubescens*. Згідно із Міжнародною базою по систематиці грибів CABI Bioscience and SBC Database of Fungal names [17], гриб тепер віднесений до роду *Trametes* та має наступне систематичне положення :

Надцарство: *Eukaryota*

Царство: *Fungi*

Підцарство: *Dikarya*

Відділ: *Basidiomycota*

Клас: *Agaricomycetes*

Порядок: *Polyporales*

Родина: *Polyporaceae*

Рід: *Trametes*

Вид: *Trametes pubescens*

1.3. Морфолого-цитологічні ознаки

T. pubescens має однорічні базидіокарпи товщиною 1-2 см [18]. Відповідно до «Визначника грибів України», продуцент має сидячі, половинчасті шапки, часто віялоподібні або черепашковидні, що часто

					ДП 6210. 00. 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		15

зростаються. За формою вони плоскуваті, тонкі або при основі потовщені, іноді з горбиком [16]. Зверху поверхня ясно або неясно зональна, радіально-борозенчасто-зморшкувата, бархатиста або войлочна. Після висихання плодове тіла дуже легкі. У свіжому стані шапки гриба білі, жовтуваті, пізніше вохряні або шкіряно-жовті. Край шапки - гострий, трохи підгорнутий. Колір тканини - білий, у сухому стані – жовтуватий, за структурою вона на початку є м'якошкірястою, потім корково-волокнистою, а на зламах – клочкувато-волокнистою (рис.1.1).



Рисунок 1.1 Плодове тіло гриба *T. pubescens* [19]

Гіменофор тубулярний, трубочки – короткі, розміром до 5 мм в довжину з тонким цілісним або дрібнозубчастим краєм. Пори мають круглу форму, діаметром 0,2-0,4 мм із розташуванням 2-4 на 1 мм. Гіфи трами шапки - септовані із доліпоровими септами, товстостінні, зрідка тонкостінні розміром 3-6,5 μ завтовшки. Товщина гіфів трубочок 2,5-3,5 μ . У зв'язку із наявністю гіфів трьох типів, тип міцелію визначається як тримітичний. Розгалуження гіфів відбувається під прямим кутом. Вони мають діаметр в межах 0,8-1,6 мкм та 2,0-4,0 мкм. Структури статевого спороношення гриба – базидії, мають розміри 12-15*4-5 μ . Утворювані спори безбарвні, циліндричні, трохи зігнуті, дещо звужені біля основи, розміром 5-8*2-2,5 μ (рис.1.2) [15,16].

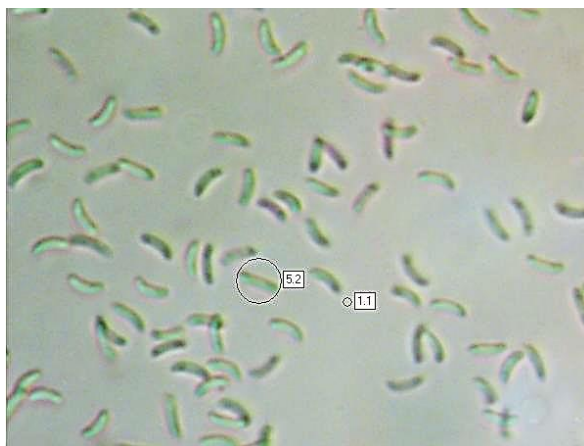


Рисунок 1.2 Спори *T. pubescens* [20]

У культурі можуть утворюватися одиничні пряжки великого розміру та круто зігнутої форми без просвіту, що є характерним для базидіоміцетів в цілому [21]. Нерегулярно відбувається утворення хламідоспор, артроспор та оїдій. Гриб здійснює формування кристалів призматичної, кубічної та голчастої форми [15].

1.4. Культуральні ознаки

Перспективи використання у промисловій біотехнології грибів роду *Trametes* набувають завдяки невибагливості до складу поживних середовищ та високих швидкостях росту при цьому. Для культивування можуть використовуватися як комплексні, так і синтетичні середовища [7]. При культивуванні *T. pubescens* на середовищах різного складу, було визначено його характерні особливості. На сусло-агарі продуцент утворює опушені випуклі колонії білого кольору та круглої форми. Характер краю колоній – рівний. Повітряний міцелій – ватоподібний, білого кольору, периферична частина колоній характеризується невеликою щільністю. При старінні культури колір міцелію, що росте рівномірно-радіально, набуває жовтого або кремового відтінку [21,22].

При глибинному культивуванні продуцент утворює міцеліальні агломерати, що мають сферичну форму (пеллети) із діаметром 4-7 мм. У

					ДП 6210. 00. 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		17

центральної частині глобул гіфи потовщені, викривлені, у великих глобулах на зрізі спостерігають зональність та порожнини. Характер поверхні глобул залежить від умов культивування [21,22].

Щодо росту культур та їх виглядом в різні періоди культивування, то колонії грибів до третьої доби культивування не мають зональності, вона починає з'являтися на четверту добу у вигляді менш щільної краєвої зони різної ширини, і є чітко вираженою на 5-7 добу [15].

1.5. Фізіолого-біохімічні ознаки

Основним компонентом, що обумовлює використання *T. pubescens* як продуцента біологічно-активних речовин є імуномодулюючі полісахариди. У плодових тілах та міцелії грибів відносно мало жирів, проте міститься значна кількість вуглеводів, що представлені розчинними цукрами (10-15%), а основну кількість складають полісахариди, до яких також входить компонент клітинної стінки- хітин [23].

Вивчення полісахаридного складу *T. pubescens* показало, що частка розчинних полісахаридів, які відносять до 1,3-β-глюканів, у клітинній стінці складає близько 2,0-2,5% від ваги сухої біомаси. Дослідження показують, що характер синтезу внутрішньоклітинних полісахаридів *T. pubescens* відповідає характеру накопичення біомаси штамом-продуцентом [24].

При проведенні досліджень визначення вмісту полісахаридів у складі гриба зі здійсненням глибинного культивування у глюкозо-пептонному середовищі, отримували значення виходу біомаси міцелію і позаклітинного полісахариду 3,5 і 0,8 г/л відповідно. Із міцелію гриба були виділені розчинна (РФр) та нерозчинна (НФр) вуглеводні фракції у співвідношенні 1:12, а також було виявлено, що ці фракції, міцелій та екзоглікан складаються з вуглеводів та білка. Відсотковий вміст вуглеводів найбільшим є у розчинній вуглеводній фракції, а частка білка має найбільше значення у міцелії, у той час як вміст мінеральних домішок є незначним (Табл. 1.1.) [21].

					ДП 6210. 00. 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		18

Таблиця 1.1 Характеристика хімічного складу міцелію, його вуглеводних компонентів та екзоглікана *T. pubescens* [21]

Зразок	Редукуючі речовини, %	Білок, %	Зольність, %	Моносахаридний склад, %				
				Glu	Xyl	Man	Gal	Fuc
Міцелій	31,0±4,2	46,0±1,9	0,2±0,05	+	сл	сл	сл	сл
РФр	82,0±3,9	16,0±1,1	0,1±0,03	77,4	2,1	14,1	4,9	1,2
НФр	50,0±2,9	8,2±0,9	0,3±0,08	73,7	2,9	13,4	9,0	0,9
ЕПС	66,3±2,546,0	17,0±1,4	0,4±0,03	49,9	1,2	31,1	17,1	0,7

*сл – слідові кількості

Одним із найважливіших факторів, що впливає на синтез полісахаридів біологічним агентом є джерело карбону в поживному середовищі. Дослідження свідчать, що джерела вуглецю для накопичення як екзо-, так і ендо- полісахаридів співпадають [24]. Зокрема, накопиченню міцеліальної біомаси продуцента *T. pubescens* сприяють легкодоступні джерела вуглецю і вигляді моно- та дисахаридів. Окрім цього, гексози є більш засвоюваними базидієвими грибами, ніж пентози. Глюкоза, як універсальне джерело вуглецю, легко фосфорилується, проте не завжди забезпечує оптимальний розвиток культури. Окрім неї, до сполук, що добре засвоюються *T. pubescens* також належать сахароза, маніт, сорбіт, крохмаль, рафіноза, гліцерин, галактоза, арабіноза та етанол. Також слід зазначити, що вуглець у складі солей органічних кислот не є сприятливим джерелом живлення для грибів даної групи [7].

Для забезпечення належного росту міцелію та вмісту протеїну в ньому необхідно правильно підібрати джерело азоту у поживному середовищі. Оскільки, на відміну від бактерій, гриби не здатні до зв'язування атмосферного азоту, вони можуть засвоювати його лише у складі неорганічних солей або органічних азотних сполук. Таким чином базидієві гриби можуть засвоювати білки, пептон, пептиди, амінокислоти, солі амонію, нітрати та нітроти. При цьому варто враховувати те, що найбільш

сприятливим для росту *T. pubescens* є пептон, оскільки за даними досліджень, отримання біомаси з його використанням у декілька разів перевищує значення отримані при використанні солі нітрату [25].

Глибинне культивування культури окрім контролю таких факторів як склад середовища і гомогенність розподілення поживних речовин у культуральній рідині, також характеризується можливістю регулювання температури, рН та процесів аерації [7].

Одним із важливих екологічних факторів, що чинить вплив на життєдіяльність та ріст грибів є температура. Температурами, при яких ріст міцелію не спостерігається, але зберігається його життєздатність з подальшим відновленням росту у сприятливих умовах – верхня та нижня граничні температури інкубації для культур базидієвих грибів. Так як міцелій трутових грибів міститься глибоко в тканинах деревини, то за рахунок її слабкої теплопровідності продуценти є стійкими до змін температур, зокрема міцелій *T. pubescens* може витримувати температурні значення діапазону 2 - 40°C. Однак, при виборі оптимального температурного режиму для росту міцелію та накопичення біомаси, перевагу надають температурам від 28 до 30-32°C [26]. Таким чином, відповідно до класифікації Хемфрі та Сігерса, що базується на оптимальному значенні температури, продуценти роду *Trametes* можна віднести до грибів другої групи [15].

Ще одним важливим фізико-хімічним фактором, що впливає на фізіологічний стан культури, є концентрація водневих іонів (рН). Вона чинить вплив на властивості клітинної стінки, швидкість росту вегетативного міцелію, особливості метаболізму, мембранні реакції, здатність до засвоєння поживних речовин, а також їх транспорт [7]. Визначення оптимального рівня рН має важливе практичне значення, оскільки є одним із контрольних чинників процесу росту грибів, особливо при здійсненні глибинного культивування. Лігнінруйнуючі гриби, серед яких продуценти роду *Trametes*, менше підкислюють середовище, ніж целюлозоруйнуючі гриби завдяки наявності у ферментній системі декарбоксилази щавелевої

					ДП 6210. 00. 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		20

кислоти. Дослідження росту афілофоральних грибів показують, що вони здатні рости у великому діапазоні рН, а оптимальні значення представників роду *Trametes* варіюють в межах рН від 3,5 до 7,5. Хоча низькі значення рН 3,0-3,2 виступають одним із найважливіших інгібуючих факторів, приведення величини в діапазон 3,0-4,0 на початкових стадіях процесу є більш технологічним рішенням. Дослідження фізіологічної активності *T. pubescens* свідчать, що діапазон значень рН, при якому відбувається найінтенсивніший синтез біомаси знаходиться в межах 4,0-6,0 [7, 15].

Оскільки досліджувані гриби в природніх умовах існування розвиваються в кисневому середовищі, то не менш важливим визначальним фактором як при рідкофазному, так і при твердофазному культивуванні міцелію є наявність кисню, тобто умови аерації [22,23]. При проведенні культивування *T. pubescens* здійснювали аерацію $1 - 1,5 \text{ дм}^3 / \text{дм}^3 \cdot \text{хв}$. Однак проведення цього процесу повинно враховувати те, що підвищення вмісту розчиненого кисню при аерації та перемішуванні може викликати травмування міцеліальних культур [15].

У зв'язку з тим, що базидієві гриби роду *Trametes* належать до дереворуйнівних, завдяки їх трофічним характеристикам, їм притаманна властивість до продукування ферментних комплексів – целюлозолітичних та окислювальних [6]. Лігнолітичний комплекс *T. pubescens* представлений такими ферментами як лакказа (Lc), лігнінпероксидаза (LiP) та манганпероксидаза (MnP), а також целобіозодегідрогеназа (CHD) [27]. Якщо говорити про синтез антибіотичних речовин, то таких даний продуцент не утворює [22].

1.6. Поширення в природі

Базидієві гриби роду *Trametes* належать до екологічної групи дереворуйнівних грибів [26], або ксилотрофів, основною функцією яких є деструкція, чи біологічне розкладання лігноцелюлозних субстратів (в

					ДП 6210. 00. 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		21

основному деревини), що знаходиться на різних стадіях розкладання [23]. Зазвичай ці гриби виконують так званий другий етап розкладання деревини, причому швидкість росту міцелію на субстраті не обробленому цвілевими грибами є вищою, так як і здатність до розкладання деревини [28].

За поширеністю у природі *T. pubescens* є космополітом. Продуцент зустрічається на листяних деревах у лісах, лісосмугах та багаторічних плодкових насадженнях, викликаючи білу гниль [18, 1]. Деревина заражена цим грибом швидко втрачає суху речовину, що виражається у втраті її питомої маси. Особливо активно цей процес відбувається у перші два роки, коли міцелій заселяє субстрат. Субстратом виступають не живі дерева, а переважно свіжа деревина : зламані вітром гілки і стовбури, залишки деревини від вирубування, пеньки та інші. Плодові тіла гриба зазвичай однорічні, що починають ріст у період закінчення червня-початку липня. Зазвичай вони зберігаються до весни, але із настанням теплої погоди швидко знищуються комахами [1].

Гриб поширений на територіях Європи, Уралу, Сибіру, Далекого Сходу, Азії та Північної Америки [23].

					ДП 6210. 00. 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		22

РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА

2.1 Характеристика кінцевого продукту

Останнім часом увагу вчених все більше привертають вивчення можливостей використання грибів в якості джерела збалансованого комплексу біологічно активних та лікувальних речовин [29]. Культивування грибів дає можливість отримати екологічно чисту сировину, яку в подальшому можна використати для створення функціональних харчових продуктів, харчових продуктів для спеціального дієтичного вживання, харчових та дієтичних добавок. Не зважаючи на переважання на даний час методів отримання препаратів грибного походження із плодових тіл, культивування міцелію на рідких поживних середовищах відбувається значно швидше, потребує менш жорстких умов та підлягаючи оптимізації та стандартизації [30].

У якості кінцевого продукту в даній роботі виступає субстанція сухої біомаси гриба *T. pubescens*, що далі може бути використана як основа для виробництва біологічно активних харчових добавок. Використання висушеної міцеліальної біомаси за таким призначенням визначається її складом, що наведений у табл. 2.1.

Таблиця 2.1 Склад сухої біомаси гриба *T. pubescens* [8]

Складова біомаси	Відсотковий вміст, %
Загальний білок	40 - 50
Вуглеводи (включаючи полісахариди бета-глікани)	25 - 30 1 - 4

					ДП 6210. 00. 000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА		
Розробив	Макогін О.О.						
Консульт.							
Керівник	Тітова Л.О.						
Затвер.							
					Стадія	Аркуш	Аркушів
					Д	23	86
					КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		

Ліпіди (включаючи ненасичені жирні кислоти, фосфоліпіди, ергостерин)	3,5 – 5,0
Нуклеїнові кислоти	3,0 – 4,5
Мінеральні речовини	6,5 – 8,5
Вітаміни	0,35 – 0,45
Вода	інше

Аналіз хімічного складу біомаси показує високий вміст білкових речовин у кількості близько 40%, а також біологічно активних компонентів. Амінокислотний склад включає усі незамінні амінокислоти, у тому числі лізин, метіонін та триптофан. Найбільший вміст припадає на глютамінову кислоту – 6,5%, аспарагінову кислоту – 3,8%, лізин і лейцин – по 2,9%, а також треонін та гліцин – по 2,2%.

Ліпідна фракція, на яку в загальному вмісті припадає 2,5-3,5% включає жирні кислоти, тригліцериди, стерини, воски та фосфоліпіди. Фракція жирних кислот представлена лише сполуками з парним числом атомів карбону і характеризується високим вмістом ненасичених жирних кислот близько 60%, серед яких у найбільшій кількості містяться олеїнова та лінолева, серед насичених жирних кислот – переважає пальмітинова.

До стеринової фракції, в основному, належать три компоненти, що включають 5-дигідроергостерин (8,5%), власне ергостерин (52,4% від суми) та його 22-дигідроаналог (39,1%). Дигідроергокальциферол відноситься до групи вітаміну D та володіє порівняною активністю, що складає близько 40% від активності самого холекальциферолу. Окрім ергостерину, що виступає у якості речовини із D-вітамінною активністю, до складу біомаси також входять водорозчинні вітаміни групи B.

До фракції фосфоліпідів належить сім компонентів, основними із яких являються фосфатидилсерин (58%), фосфатидилетаноламін (серин) у кількості 24% та фосфатидилхолін (лецитин) – 18%. У складі також містяться такі мінеральні компоненти як кальцій, калій, фосфор, магній, ферум та інші фізіологічно-активні макро- та мікроелементи в органічно зв'язаній формі [8].

Основною структурою гриба, що забезпечує сорбційну здатність його біомаси є клітинна стінка, що містить значну кількість хітину, мікрофібрилярна будова якого створює велику сорбційну поверхню та має можливість хімічної модифікації [31]. Сам механізм сорбції полягає в утворенні хелатів при зв'язуванні з важкими металами [32]. Найбільш загальною формою хітину є α -хітин [33]. За хімічною природою він є лінійним полімером, до молекули якого входять β -1,4-зв'язані одиниці N-ацетилглюкозаміну, що в оболонках клітин гриба зібрані в кристаліти [34].

Хімічний склад міцеліальної біомаси вказує на те, що основним діючим компонентом біомаси гриба *T. pubescens*, що викликає його біологічну активність, є саме полісахариди – β -глюкани (рис. 2.1).

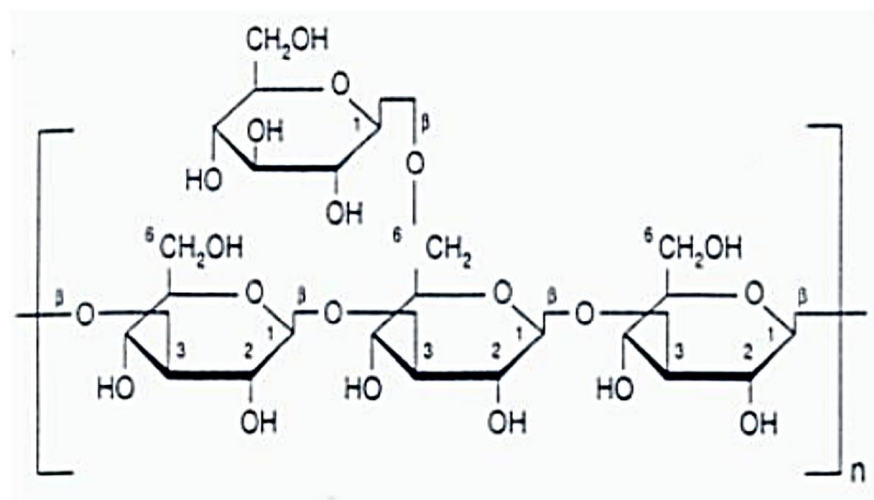


Рисунок 2.1 Структура β -глюкана [35]

Дослідження сухої міцеліальної біомаси без урахування золи складає 35%, серед яких основна частина припадає на нерозчинний глікано-хітиновий комплекс, частка ж розчинних полісахаридів клітинної стінки

складає близько 2,0 - 2,5%. Моносахаридний склад представлений глюкозою, вміст 1,3-глікозидних зв'язків складає 35% - такі дані дозволяють охарактеризувати полісахариди клітинної стінки гриба як 1,3- β -глюкани, що відносяться до групи імуномодулюючих полісахаридів [33], що за природою є водорозчинними β -глюканами з розгалуженою структурою [35].

2.2. Схема хімічних перетворень

У даному проекті цільовим продуктом виступає міцеліальна біомаса гриба *T. pubescens*, синтез якої здійснюється шляхом глибинного культивування. У зв'язку з цим одним із найважливіших аспектів проведення цього процесу є наявність даних про вплив компонентів поживного середовища, що виступають джерелами його живлення на ріст культури та її властивості. Таким чином необхідно виявити найбільш сприятливі джерела карбону та нітрогену для розвитку продуцента, щоб здійснювати культивування на середовищі оптимального складу.

Процес росту гриба проходить за експоненціальним законом, що робить можливим його застосування у зв'язку з морфологією продуцента, тобто нитчастою формою росту та формуванням невеликих кульок, у яких проходить вільний масообмін між міцелієм та поживним середовищем. У разі збільшення розміру та ущільнення кульок, а також при підвищенні концентрації біомаси до значення 10-15г/л, характер росту змінюється [15].

Оскільки продуктивність біологічного агента при періодичному процесі глибинного культивування, що триває протягом визначеного часу, не повинна бути нижчою 3-5 г/л-добу з економічним коефіцієнтом за карбоном 50%, то обраний штам *T. pubescens* 923-2 повністю задовольняє ці вимоги [15].

Речовини, що виступають джерелами вуглецевого та азотного живлення відіграють значну роль в процесі культивування продуцентів-базидіоміцетів. Здатність засвоювати джерела карбону у значній мірі може змінюватися від

					ДП 6210. 00. 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		26

природи самого продуцента. Сполуки, які містять карбон, відіграють дві важливі функції в метаболізмі цих організмів-гетеротрофів: по-перше, постачають вуглець для синтезу речовин живої клітини, а по-друге, приймають участь в окисних процесах, де вони є єдиним джерелом енергії. Ступінь доступності сполуки для організму продуцента визначається її структурою, тому для накопичення міцеліальної біомаси *T. pubescens* найбільш сприятливими визначають моноцукри та дицукри, що зазнають подальших перетворень в ферментативних реакціях [7].

В енергетичному обміні значення такого ферментативного процесу як гліколіз відносно невелике. Це пов'язано з тим, що вихід енергії цього процесу в десятки разів нижчий, ніж у дихальному ланцюгу. Загальною метою цього процесу в організмі гриба є подача метаболітів для подальших біосинтетичних процесів, що необхідні для нормального функціонування, серед яких :

- сполуки, необхідні для синтезу клітинних оболонок, зокрема їх складових;
- пентози для синтезу нуклеїнових кислот;
- запасні речовини для ендогенного отримання енергії : глікоген, жири, гліцерин та ацетальдегід;
- метаболіти, що далі включаються в цикл трикарбонових кислот;
- речовини для синтезу ароматичних амінокислот;
- сполуки для біосинтезу терпенів, жирів та ароматичних сполук, що не містять нітрогену.

Таким чином, основною роллю гліколізу в обміні речовин є саме здійснення конструктивного метаболізму. Наступним етапом є цикл Кребса, через який проходить основний обмін речовин, оскільки він є джерелом основного матеріалу для синтезу білка, пуринів і піримідинів, а також різних кофакторів ферментів (рис.2.2) [36,37].

					ДП 6210. 00. 000 ПЗ	Арк.
						27
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

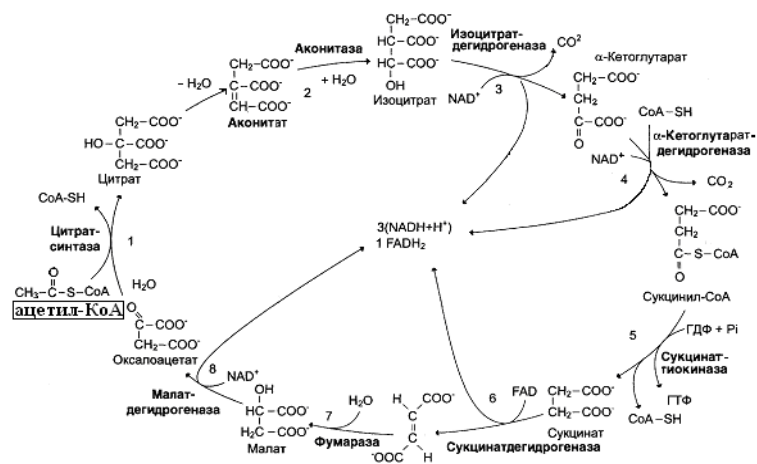


Рисунок 2.2 Схема циклу трикарбонових кислот (цифри відповідають номерам реакцій) [38]

Загальновизнаним є те, що гриби можуть використовувати як органічні так і неорганічні сполуки азоту і поділяються за цією властивістю на чотири групи згідно з Роббінсом. Азот є важливим складовим живлення оскільки в подальшому входить до складу клітинної стінки, білків, пептидів та амінокислот, нуклеїнових кислот та ін. Нітратний азот засвоюється грибом завдяки наявності системи нітрат-редуктази, однак часто вона є лише адаптивною. Чисельні дослідження показують, що обраний продуцент при культивуванні найкраще накопичує біомасу саме при використанні органічних джерел азоту, що далі засвоюється у формі амінного азоту, амінокислот, пептидів та білків, що треба враховувати при виборі компонентів поживного середовища [7, 36].

2.3. Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології

Даний препарат являє собою субстанцію сухої біомаси лікарського базидієвого гриба *T. pubescens*. Отримання субстанції відбувається шляхом глибинного культивування штама-продуцента.

Біологічна активність препарату зумовлена його складом, що включає глікано-хітиновий комплекс (близько 30%) та розчинні 1,3-β глюкани (2-3%),

що належать до групи імуномодуючих полісахаридів. Наявність у складі таких сполук як амінокислоти, низькомолекулярні пептиди, есенціальні фосфоліпіди, ергостерин, ненасичені жирні кислоти, убіхінони, вітаміни, олігосахариди, мікроелементи та харчові волокна зумовлюють його пребіотичний ефект [31]. Оцінка за санітарно-хімічними та санітарно-мікробіологічними показниками проводиться згідно з СанПіН "Тимчасові гігієнічні нормативи вмісту контамінантів хімічної і біологічної природи в БАД". Гігієнічні нормативи ГН 4.4.8.073—2001 [39].

2.4 Методи очистки цільового продукту

Цільовий продукт, що отримується у результаті реалізації технології являє собою міцеліальну біомасу гриба *T. pubescens*, відділену від культуральної рідини шляхом фільтрування з використанням фільтр-преса та з подальшим сушінням. У зв'язку з тим, що широкий спектр дії препарату обумовлюється саме комплексністю хімічного складу речовин, наявних у біомасі, без виділення окремих сполук, то спеціальні методи очистки в даному технологічному процесі не використовуються [40].

2.5. Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси

Відомо, що гриби, подібно до інших продуктів харчування у великих дозах можуть чинити негативний вплив на організм. У зв'язку з цим необхідні достовірні дані про спектр властивостей, які можуть здійснювати ці продукти по відношенню до нього [15].

Однією з головних особливостей цільового продукту є його позитивний вплив на імунітет. На даний час імунологічна реактивність розглядається як універсальна захисна реакція, що слугує показником загального супротиву резистентності організму. Імунологічний гомеостаз здійснюється морфофункціональним субстратом, яким являються лімфоцити:

					ДП 6210. 00. 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		29

тимусзалежні (Т-лімфоцити), тимуснезалежні (В-лімфоцити) і макрофаги (А-клітини). Т-система реалізує імунну відповідь клітинного типу, В-система реалізує гуморальну відповідь, а також контролюється Т-системою [22].

Дослідження, що були проведені з метою оцінки впливу цільового продукту на клітинний імунітет, свідчать, що прийом цього препарату сприяє збільшенню абсолютного та відносного числа лімфоцитів, Т-лімфоцитів та О-лімфоцитів. Наряду з цим прослідковувалася тенденція до зниження рівня еозинофілів та збільшення абсолютного числа В-лімфоцитів. Загалом, дія продукту проявляється в нормалізуючому впливі на кількість та співвідношення Т- та В-лімфоцитів.

Ще одна властивість біомаси – позитивний вплив на ферментативні системи печінки, що пов'язано з її дезінтоксикаційними властивостями. Метаболічні перетворення токсичних продуктів у печінці здійснюється за участі ферментативної системи ендоплазматичного ретикулуму печінки. Визначення оксидаз-змішаної функції печінки дозволяє здійснити оцінку ефективності даного продукту. Таким чином, було досліджено, що продукт сприяє відновленню дезінтоксикаційної функції печінки, що проявлялося у відновленні оксидаз-змішаної функції в досліджуваних осіб [22].

Перспективність продукту також визначається його можливістю у використанні у курсі з хіміотерапією, оскільки відбувається запобігання або ж гальмування розвитку пухлин та перешкоджання росту метастазів (рис.2.3). Така дія забезпечується впливом полісахаридів на імунну систему організму. Зокрема, одним із механізмів є стимулююча дія на клітини фагоцитарної системи, що проявляється у активації фагоцитозу, внутрішньоклітинній бактерицидності, цитотоксичності та секреції імунорегуляторних цитокінів [6].

Ефективність впливу біомаси гриба на організм було виявлено на основі дослідження кількості онкомаркерів у крові, чиє число значно знижувалося. Зокрема, у меншій кількості накопичувалися раково-ембріональні антигени, феритин, що накопичується при пухлинах травної системи, карбогідратний

					ДП 6210. 00. 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		30

антиген (СА-125), пов'язаний з пухлинами яєчників та мусциноподібний антиген (МЦА), ріст якого виявляється при пухлинах молочної залози [15].

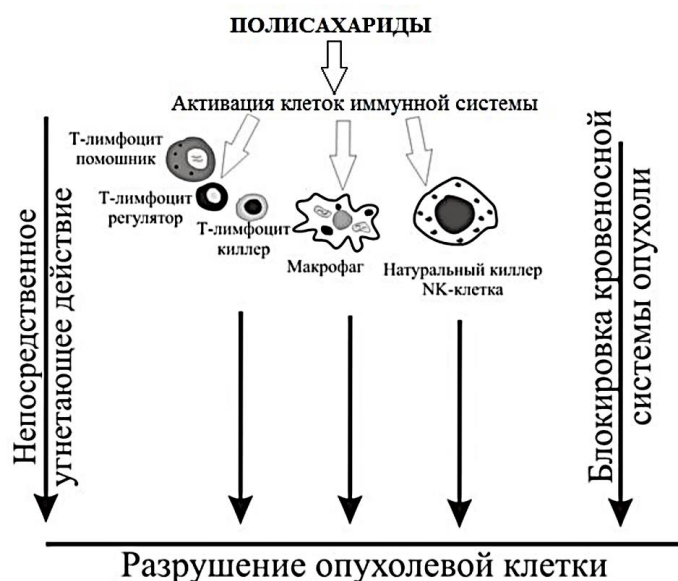


Рисунок 2.3 Механізм руйнування пухлинних клітин полісахаридами базидіоміцетів [35].

Медико-біологічні та клінічні дослідження, проведені з цим продуктом показують його високу біологічну активність. Основний напрямок терапевтичної дії, що підтверджений клінічно – онкостатичний, гепатопротекторний та імуномодулюючий. Таким чином показана нетоксичність продукту для людини, біологічна активність та клінічна ефективність (табл. 2.2) [15].

Таблица 2.2 Клінічна ефективність препарату сухої біомаси *T.pubescens* 923-2 [15]

Напрямок клінічної дії	Прояви, що клінічно фіксуються	Аналізовані показники
Онкостатична	Зниження рівня накопичення пухлино-асоційованих антигенів (онкомаркерів)	Раково-ембріональний антиген (РЕА)
		Феритин
		Карбогідратний антиген (СА-125)

Гепатопротекторна	Відновлення дезінтокикаційних властивостей печінки	Відновлення до фізіологічної норми оксидаз-змішаної функції печінки
Імуномодулююча	Нормалізація клітинного імунітету	Кількість та співвідношення Т- і В- лімфоцитів

Таким чином, виявлені в процесі досліджень властивості продукту, отриманого в результаті реалізації технології, дозволяють визнати його перспективним засобом при використанні в комплексній терапії для здійснення вище вказаних функцій.

РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ

3.1 Генетична вивченість біологічного об'єкту

На сьогодні досить активно проводяться дослідження, що мають на меті вивчення фізіології, біохімії та генетики базидійних грибів, а завдяки інтенсивному розвитку біоінформаційних ресурсів, більш доступним стає детальний аналіз транскриптомів, протеомів та секретомів грибів, зокрема, є секвенованими та частково анотованими близько сорока геномів різноманітних базидіоміцетів. Ці дані досить важливі з точки зору вивчення біології та еволюції видів, оскільки поєднання інформаційних ресурсів з експериментальними дослідженнями сприяють прискоренню здійснення пошуку та подальшого отримання цільових ферментів та біологічно активних сполук грибних організмів [40].

Широкий спектр застосування базидієвих грибів зумовлений їх властивостями та компонентним складом біомаси, однак, не зважаючи на це, генетична вивченість великої кількості організмів даного таксону не є достатньо дослідженою [41]. Продуценти роду *Trametes*, володіючи лігнолітичною активністю, вивчаються генетично здебільшого з точки зору синтезу ферментів, зокрема, лакказ [42,43]. На даний час, згідно з останніми даними Національного центру біотехнологічної інформації, NCBI (National Center for Biotechnological Information), секвеновано геном гриба *T. pubescens* та виявлено, що загальна його довжина складає 39,7 Мб, відсотковий вміст ГЦ-пар дорівнює 57,5 % [44]. Генетичні механізми, що лежать в основі синтезу глюканів, речовин білкової природи та ліпідів обраним продуцентом

					ДП 6210. 00. 000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив		Макогін О.О.			РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ	Стадія	Аркуш	Аркушів
Консульт.						Д	33	86
						КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
Керівник		Тітова Л.О.						
Затвер.								

ще не є вивченими і ще досліджуються [41].

3.2 Загальні методи створення високопродуктивного промислового продуценту

На даний час накопичено значну кількість експериментального матеріалу, що дозволяє краще висвітлити питання, що пов'язані з глибинним культивуванням вищих базидіоміцетів, однак основні принципи й критерії, які повинні бути використані при відборі та селекції штамів-продуцентів міцеліальної біомаси базидієвих грибів потребують подальших досліджень [45].

Серед основних методів селекції грибних організмів визначають добір, індукований мутагенез та гібридизацію [46]. В основі створення високопродуктивних штамів є вдосконалення вже відомих використовуваних продуцентів або пошук нових [45]. Окрім високої продуктивності, біологічний агент повинен володіти й іншими ознаками, серед яких висока швидкість росту на поживних середовищах, стійкість до несприятливих факторів, стабільність фізіолого-біохімічних ознак при культивуванні, а також його стійкість при зберіганні [47].

У даному проекті, головною характеристикою для вибору продуцента є його здатність до накопичення міцеліальної біомаси на середовищі визначеного складу.

3.2.1. Використання природного та штучного добору для отримання промислових продуцентів

Особливу увагу серед різних груп вищих базидіоміцетів надають саме ксилотрофним грибам, так як більшість з них відносно легко виділяється в чисту культуру із природного середовища існування, характеризується

					ДП 6210. 00. 000 ПЗ	Арк.
						34
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

швидким ростом та не потребують особливих компонентів у поживному середовищі для культивування [32].

Природний добір являє собою явище виживаності організмів із певним фенотипом завдяки їх пристосованості до умов навколишнього середовища, однак для отримання промислових продуцентів базидієвих грибів більш використовуваним є метод штучного добору, тобто селекції грибів з найвищою продуктивністю. Задачу селекції цільових ознак можна сформулювати як підвищення в генотипі концентрації спадкових факторів, що визначають ці ознаки, тобто концентрації плюс-мутацій. Зокрема, для *Pleurotus ostreatus* та *Agaricus bisporus* було встановлено, що штами, які найбільш активно ростуть на широкому спектрі середовищ із карбон- та азотовмісними речовинами, характеризуються вищою продуктивністю [48].

Процес здійснення штучного добору включає декілька етапів : вибір вихідного штаму для селекції, пасажування і відбір найбільш продуктивного штаму та стабілізації культури. Підготовчий етап має на меті вивчення природньої мінливості продуцента за рівнем синтезу бажаного продукту. Таким чином, для початку проводять «чистку культури», тобто серед не менше 100 клонів вихідного штаму (із типовою для даного виду морфологією) відбирають один клон, що володіє найбільш високим (у порівнянні з вихідним продуцентом) та відтворюваним при пересівах рівнем продукування цільової речовини.

Стабілізація культури за кількісною ознакою відбувається шляхом проведення розсіву на чашки Петрі та подальшій оцінці рівня продуктивності не менше 100 клонів першого покоління. Значення рівня синтезу продукту цих субклонів виражають у відсотках по відношенню до рівня продуктивності батьківського клона та розподіляють у вигляді варіаційного ряду. Обчислюють середнє арифметичне, середньоквадратичне відхилення та коефіцієнт мінливості. Субклонів із правої крайньої частини ряду повторно оцінюють за рівнем синтезу продукту та залишають одного з них. Після чого, його піддають повторному пересіву, оцінці продуктивності та побудові

					ДП 6210. 00. 000 ПЗ	Арк.
						35
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

варіаційного ряду на основі отриманих даних. У результаті порівняння двох варіаційних рядів, за умови, що вони достовірно не відрізняються, закінчують підготовку культури, залишивши субклон із високим рівнем синтезу. Якщо ж відбулося зниження продукування, то із правої частини знову відбирають кращого клона, розсівають його та аналогічно попереднім етапам, проводять оцінку. У результаті такого ступінчастого клонування під дією стабілізуючого відбору отримують найбільш однорідну за даною ознакою популяцію [46].

3.2.2. Використання індукованого мутагенезу

Важливим методом отримання штамів-продуцентів є індукований мутагенез та відбір найбільш продуктивних варіантів. Оскільки спонтанні мутації виникають рідко - виділення таких мутантів є доволі довготривалим та трудомістким процесом [49,50]. Біологічною основою індукованого мутагенезу є внесення помилок до матричного процесу реплікації ДНК, що у випадку нелетальних мутацій може призвести до зміни фенотипу продуцента [46].

Для підвищення частоти виявлення мутацій використовують різні мутагенні фактори, серед яких фізичні (УФ- та рентгенівське випромінювання, γ -промені), що часто застосовують до базидієвих грибів, а також хімічні (нітратна кислота, алкілюючі сполуки, аналоги основ та інші) мутагени [48,50].

Використання індукованого мутагенезу передбачає обробку культури мутагеном, висів її на селективні агаризовані поживні середовища, отримані окремі колонії досліджують на продуктивність, і потім повторюють процес для відбору найбільш продуктивних варіантів [50].

Серед базидіоміцетів індукований мутагенез використовували шляхом обробки спор гриба *Pleurotus ostreatus* різними дозами УФ-променів, механізм дії яких полягає в підвищенні енергетичного рівня молекул, що

					ДП 6210. 00. 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		36

призводить до утворення димерів піримідинів, розриву водневих зв'язків, зшивок полінуклеотидного ланцюга та білка. Літературні дані про застосування мутагенів у селекції грибів даного роду обмежені використанням 1-метил-3-нітро-1-нітрозогуанідину та γ -опромінення, що в результаті давали підвищення продуктивності цього організму [48].

3.2.3. Використання гібридизації для створення промислових продуцентів біологічно-активних речовин

Істинна гібридизація при селекції продуцентів застосовується для грибних організмів, і її значення полягає в утворенні нових комбінацій алелей в нащадків, тобто відбувається генетична рекомбінація. Статева гібридизація у грибів відділу *Basidiomycota* досягається при схрещуванні гомокаріотичних міцеліїв. У результаті цього процесу отримують штами із економічно значимими ознаками батьківських організмів. Для проведення статевої рекомбінації використовують колекції культур первинних міцеліїв (гомокаріонів), які після ряду маніпуляцій та схрещування утворюють гетерокаріон, який потім перевіряють на наявність необхідних ознак.

Парасексуальна, або вегетативна, рекомбінація грибів для проведення потребує злиття дикаріотичних міцеліїв або протопластів. У результаті процесу корисні ознаки можуть бути передані від споріднених видів грибів за неможливості здійснення статевої гібридизації. У міцеліальних грибів парасексуальна рекомбінація можлива як в природніх умовах, так і в умовах експерименту [46].

Метод ізольованих протопластів, який широко застосовується в селекції вищих рослин є перспективним і в селекції базидієвих грибів. Він дозволяє зливати протопласти різних видів грибів та отримувати різноманітний склад властивостей в одному дикаріоні [48]. Відомо, що за допомогою використання цього методу можна отримувати міжвидові форми грибів.

					ДП 6210. 00. 000 ПЗ	Арк.
						37
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Отримання протопластів, відповідно до літературних даних, залежить від використовуваного виду базидіального гриба і є достатньо видоспецифічним процесом. Результати досліджень свідчать про те, що для *Trametes versicolor*, *Pleurotus pulmonarius* та *Pleurotus florida* для процесу отримання цих структур використовуються лише ферментні препарати, а для *Trametes hirsuta* потрібна також стадія додаткового руйнування міцелію. Для *Trametes pubescens* такі дані відсутні [51].

Злиття протопластів зазвичай проходить з частотою 0,2 - 2%, а вірогідність злиття ядер, життєздатність та стабільність фузантів в таких експериментах залежать від ступеня спорідненості штамів, що схрещують [47]. Наприклад, було показано можливість утворення гетерокаріона *Schizophyllum commune* і *Sascharomyces cerevisiae*. Зважаючи на те, що в результаті утворення гетерокаріона при злитті протопластів, структура може бути не досить стабільною, то цей метод не є доцільним для використання при роботі з даним продуцентом [48].

3.3 Схема отримання продуцента, що використовується в роботі

Створення високоактивних штамів із заданими властивостями у своїй більшості залежить від рівня знань про організацію генома та регуляцію метаболізму мікробної клітини [47]. Роль генотипу в отриманні ефективних результатів ускладнює питання вибору того чи іншого мутагену для селекції і вирішувати питання ефективності того чи іншого мутагенного фактору без урахування особливостей продуценту не можна, оскільки він може бути дієвим для одного організму та чинити зворотній вплив на інший [52]. Враховуючи наведену вище інформацію, для отримання продуцента *Trametes pubescens* буде використано метод штучного добору (рис. 3.1), оскільки він дозволяє отримати промисловий продуцент із високим значенням швидкості росту без виконання складних маніпуляцій.

					ДП 6210. 00. 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		38



Рисунок 3.1. Схема отримання промислового продуценту *Trametes pubescens* 923-2

Для проведення селекції обрали вихідний продуцент - у даному випадку *Trametes pubescens*-923. Для початку проводили відновлення музейної культури шляхом висіву її на агаризоване середовище. Культивування відбувалося протягом шести діб при температурі 27±1°C.

Основою поживного середовища на даному етапі є ячмінно-солодовий екстракт із додаванням агару в концентрації 20 г/л.

Отриманий посівний матеріал із агаризованого середовища переносили в рідке поживне середовище на основі меляси для культивування в качалкових колбах. Цей етап біосинтезу проходить за аналогічної температури протягом 3 діб з частотою обертання качалки 180 об/хв.

Міцелій після культивування двічі промивають фізіологічним розчином для отримання окремих колоній, які потім висівають в колби з мелясним поживним середовищем та культивують аналогічним чином. Після 3 діб проведення біосинтезу, у культуральній рідині визначають вміст редуруючих речовин (РР). Для цього проводять її аналіз методом Бертрана (значення вмісту РР знаходиться в межах 0,9 – 0,19 %). Кількість одержаної біомаси визначаємо гравіметричним методом з перерахунком її в г/л [53]. Оскільки складовою, що забезпечує основні цільові властивості біомаси є β -глюкани, то відбір продуцентів проводять саме за їх вмістом від ваги сухої біомаси. Визначення цих сполук проводять шляхом аналізу виділеного осаду полісахаридів антроновим методом.

Шляхом проведення ряду досліджень та аналізу їх даних, було обрано штам *Trametes pubescens* 923-2, що характеризується найвищим показником накопичення біомаси – 7-8 г/л. Враховуючи те, що характер синтезу накопичення внутрішньоклітинних полісахаридів відповідає характеру накопичення біомаси, то цей продуцент має властивість накопичувати і найбільший вміст β -глюканів – близько 2% [24].

Таким чином, обраний штам далі піддають повторним висівам та культивуванню аналогічно до попередніх операцій з визначенням показників накопичення біомаси та β -глюканів. Отриманий продуцент із визначеними характеристиками до синтезу цільових продуктів впроваджують у виробництво.

					ДП 6210. 00. 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		40

4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

4.1 Характеристика кінцевої продукції виробництва

Кінцевий продукт являє собою суху біомасу гриба *T.pubescens*, виготовлену згідно з ТУ 9197-002-14271530-05 [54] та запаковану в полімерні пакети.

Областю застосування продукту є використання його як основи з гепатопротекторними, онкостатичними та імуномодулюючими властивостями при виробництві біологічно активних добавок в якості джерела β -глюканів. Разом із цим, він не підлягає роздрібній торгівлі серед населення.

Зовнішній вигляд готового продукту представлений порошком сірувато-білого кольору, що володіє слабким специфічним грибним запахом із вологістю не вище 7%. Стандартизація продукту відбувається за вмістом в ньому полісахаридів, зокрема - водорозчинних β -глюканів (за ГОСТ Р 57513-2017) у кількості не менше 1% , які є показником його біологічної активності.

Відповідно до СанПіН 2.3.2.1078-01, готовий продукт повинен відповідати мікробіологічним показникам, що наведені в табл. 4.1.

Таблиця 4.1 Мікробіологічні показники готового продукту [54]

Назва показника	Норма
Кількість мезофільних аеробних та факультативно-анаеробних мікроорганізмів, КУО/г	Не більше 10^4

					ДП 6210. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив		Макогін О.О.			РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА	Стадія	Аркуш	Аркушів
Консульт.						Д	41	86
						КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
Керівник		Тітова Л.О.						
Затвер.								

Бактерії групи кишкової палички в 0,1 г	Не допускаються
<i>E.coli</i> в 1,0 г	Не допускаються
<i>S. aureus</i> в 1,0 г	Не допускаються
<i>B. cereus</i> , КУО/г	Не більше 200
Патогенні мікроорганізми, у т.ч. сальмонелли, в 10,0 г	Не допускаються
Дріжджі, КУО/г	не більше 100
Пліснява, КУО/г	Не більше 100
Кількість живих клітин-продуцентів в 10,0 г	Не допускаються

Сушу міцеліальну масу фасують у чисті сухі полімерні пакети (ГОСТ 12302-83) із поліетиленової плівки, що відповідає ГОСТу 10354, масою 5 кг. Шви пакетів повинні бути звареними таким чином, щоб забезпечити їх міцність та герметичність. На пакетах вказують назву підприємства-виробника, найменування продукції, номер партії, дату виготовлення, масу нетто, позначення відповідного нормативно-технічного документу на продукт та його гарантійний термін зберігання.

Продукт, фасований у пакети, по 5 одиниць вкладають у групову тару у вигляді картонних коробок згідно з ГОСТ 9142-2014. Транспортне маркування здійснюють відповідно до ГОСТ 14192-96 із нанесенням маніпуляційного знаку «Берегти від вологи». Транспортування сировини має здійснюватися в сухих чистих, без стороннього запаху критих транспортних засобах.

Продукт зберігається в сухих, добре провітрюваних складських приміщеннях при температурі не вище 25°C. Термін придатності продукту становить 2 роки від дати виготовлення [54].

4.2 Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві

Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів для даної технології виробництва наведена в Таблиці 4.2.

Таблиця 4.2 Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів

Найменування	Категорія і номер НТД, згідно якої перевіряються показники якості	Показники, що обов'язкові для їх перевірки та їх нормативне значення	Примітка
1	2	3	4
1. Основна сировина:			
1.1. Амоній азотнокислий (NH_4NO_3)	ГОСТ 22867-77	Масова частка NH_4NO_3 не менше 99 %	Компонент ПС
1.2. Вода питна	ДсанПіН №383	Кольоровість, каламутність, смак, запах, рН, жорсткість, вміст мікроорганізмів, бактерій згідно з ДСанПіН	Для приготування розчинів, для мийки обладнання, компонент ПС
1.3. Калій фосфорнокислий однозаміщений (KH_2PO_4)	ГОСТ 4198-75	Масова частка KH_2PO_4 не менше 98 %	Компонент ПС
1.4. Меляса бурякова	ДСТУ 3696-98	Усі показники відповідно до ДСТУ (вміст редукуючих речовин - 43%)	Компонент ПС
1.5. Сечовина	ГОСТ 2081-2010	Усі показники відповідно до ГОСТу (масова частка азоту не менше 46,2%)	Компонент ПС
2. Допоміжна сировина :			

Продовження Таблиці 4.2

2.1.Засіб миючий синтетичний	ГОСТ 25644-96	Усі показники відповідно до ГОСТу (миюча здатність не менше 80%)	Для приготування миючих розчинів
2.2.Кислота сульфатна (H ₂ SO ₄)	ГОСТ 2184-2013	Усі показники відповідно до ГОСТу (масова частка моногідрату 92,5-94,0%)	Для регулювання рН
2.3.Натрій гідроксид (NaOH)	ГОСТ 4328-77	Усі показники відповідно до ГОСТу (масова частка NaOH не менше 99%)	Для регулювання рН
2.4.Перекис водню (H ₂ O ₂)	ГОСТ 177-88	Масова частка речовини - 33%	Дезінфікуючий розчин
2.5.Пропінол	ТУ 6-14-300-80	Усі показники відповідно до ТУ	Піногасник
2.6.Спирт етиловий (C ₂ H ₅ OH)	ДСТУ 4221:2003	Масова частка спирту - 96%	Дезінфікуючий розчин
2.7.Стерилліум	Реєстраційне посвідчення № UA/5846/01/01	Зовнішній вигляд, маркування, термін придатності, цілісність пакування, паспорт постачальника	Засіб для антисептичної обробки рук персоналу
3. Матеріали :			
3.1.Картонні коробки	ГОСТ 9142-2014	Зовнішній вигляд, цілісність, розміри	Групова тара для готового продукту
3.2.Пакети поліетиленові	ГОСТ 12302-83	Зовнішній вигляд, цілісність Товщина плівки 0,08-0,12 мм	Пакування готового продукту
3.3.Папір етикеточний	ГОСТ 7625-86	Зовнішній вигляд	Нанесення на пакети
3.4.Стрічка клеєва на паперовій основі	ГОСТ 18251-87	Усі показники відповідно до ГОСТу (ширина бабіни)	Для заклеювання коробок

3.5.Фарба штемпельна	ГОСТ 6-15-459-90	Швидкість висихання, зовнішній вигляд	Для маркування продукту
----------------------	------------------	---------------------------------------	-------------------------

4.3 Опис технологічного процесу

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

Цей етап допоміжних робіт передбачає виконання таких операцій, що забезпечать відповідну якість цільового продукту на усіх стадіях технологічного процесу. Санітарна підготовка виробництва, як і наступні стадії технологічного процесу, проводиться згідно з нормативно-технологічною документацією.

ДР 1.1 Підготовка персоналу

ДР 1.1.1 Медичне обстеження персоналу

Перед початком роботи персонал в обов'язковому порядку повинен пройти медичний огляд [55]. Необхідна наявність інструкцій, відповідно до яких забезпечується контроль стану здоров'я співробітників, що може вплинути на якість продукції. Після першого медичного огляду, подальші проводяться періодично. Дані про обстеження заносять до відповідних журналів на виробництві.

ДР 1.1.2 Навчання персоналу

Персонал, що працює на виробництві відповідно до встановленої програми, проходить навчання з метою подальшого кваліфікованого виконання обов'язків та заходів з охорони праці. Таким чином обов'язковим є етап проходження інструктажу з техніки безпеки. Окрім цього, потрібно проводити подальше навчання персоналу, періодично перевіряючи його практичну ефективність.

ДР 1.1.3 Підготовка персоналу до роботи

Персонал, що бере участь у виробництві, перед влаштуванням на роботу, повинен бути навчений правилам особистої гігієни та систематично

					ДП 6210. 00. 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		45

проходити санітарно-гігієнічне навчання в подальшому, і неухильно дотримуватися гігієнічних вимог, які відповідають його діяльності.

Увесь персонал повинен носити захисний одяг, що відповідає виконуваним ним операціям та здійснювати належну обробку рук антисептичними засобами. Для роботи у приміщенні класу D волосся і борода мають бути закриті, рекомендованим є носіння звичайного захисного костюму та відповідного взуття або бахіл. Одяг для чистих приміщень необхідно очищати та поводитися з ним таким чином, щоб не піддавати його додатковому забрудненню, що може стати причиною контамінації, тож ці роботи варто виконувати відповідно до письмових методик.

Працівники виробництва мікробіологічної галузі мають дотримуватися правил поведінки у приміщеннях чистоти певних класів. Для виконання цих правил, у приміщеннях мають знаходитися розроблені письмові інструкції. Співробітників, які не пройшли навчання, не можна допускати до зон виробництва та контролю якості.

ДР 1.2. Приготування миючих та дезінфікуючих розчинів

Для запобігання виникнення ризику контамінації цільового продукту, приміщення, а також обладнання повинні пройти обробку дезінфікуючими засобами. Допускається використовувати мийні та дезінфекційні засоби, які в установленому порядку зареєстровані в Україні і дозволені до використання на підприємствах хіміко-фармацевтичної промисловості. Як мийні засоби забороняється використовувати органічні розчинники, а також використовувати їх для приготування робочих розчинів мийних та дезінфікуючих розчинів. Також рекомендується чергувати дезінфікуючі засоби кожні 1-3 місяці з метою запобігання розвитку та розповсюдженню стійких варіантів мікроорганізмів.

Миючі та дезінфікуючі засоби необхідно контролювати щодо мікробіологічної чистоти, а їх розчини тримати в попередньо очищеній тарі і зберігати лише протягом визначених термінів. Приготовані робочі розчини використовують одноразово. Підготовка цих розчинів включає етапи

					ДП 6210. 00. 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		46

приготування та зберігання. Відповідно до подальшого призначення робочих розчинів їх використовують для обробки обладнання та комунікацій, а також приміщень (миючий розчин та робочий розчин пероксиду водню).

Приготування розчинів здійснюють із дотриманням правил безпеки, що забезпечують захист шкіри, слизових оболонок очей, верхніх дихальних шляхів [55].

ДР 1.2.1. Приготування розчину миючих засобів

Для приготування робочого розчину до ємності за допомогою дозатора заливають визначений об'єм миючого засобу та розводять водою, перемішують розчин та використовують одноразово.

ДР 1.2.2. Приготування розчину етилового спирту

Робочий розчин спирту готують шляхом розведення 96%-го розчину етилового спирту питною водою до концентрації 76% - у такій концентрації його рекомендується використовувати для дезінфекції обладнання, а також антисептичної обробки рук персоналу.

ДР 1.2.3. Приготування розчину пероксиду водню

Для дезінфекції технологічного обладнання та комунікацій рекомендується використовувати розчин пероксиду водню в концентрації 6 %. Робочий розчин готують шляхом розведення 33%-го розчину пероксиду водню водою до зазначеної концентрації.

ДР 1.3. Підготовка виробничих приміщень

Підготовка виробничих приміщень представляє собою комплекс заходів, виконання якого спрямоване на досягнення відповідного класу чистоти. Підготовку приміщень варто проводити в одязі передбаченому для виробничих приміщень того ж класу чистоти. Підготовка приміщень проводиться відповідно до «Методичних рекомендацій щодо підготовки виробничих приміщень» [55].

ДР 1.3.1. Щоденне прибирання

Проведення щоденного прибирання здійснюється після кожної зміни у визначеній послідовності, відповідно до методики, розробленої на

					ДП 6210. 00. 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		47

виробництві. Комплекс дій включає вологе прибирання підлоги, дверей, столів та інших поверхонь приміщення розчином мийного засобу, потім проводять промивання теплою водою та висушують. Для покращення якості чистоти приміщення застосовують обробку ультрафіолетовим випромінюванням протягом визначеного часу, після звільнення приміщення від персоналу.

Після закінчення прибирання приміщення, оформляють відповідну документацію про санітарно-гігієнічний стан цього приміщення. Перед початком роботи, щоденно відбувається протирання робочих поверхонь дезінфікуючим розчином.

ДР 1.3.2. Генеральне прибирання

Процес генерального прибирання проводиться на виробництві з періодичністю один раз на тиждень. Обробка поверхонь стін, стелі, здійснюється з використанням спочатку миючих, а потім дезінфікуючих розчинів, крім цього здійснюють дезінфекційну обробку підлоги. Таким чином, окрім цього ще виконують усі заходи щоденної підготовки приміщень.

ДР 1.5. Підготовка обладнання та комунікацій

Комплекс робіт з підготовки обладнання та комунікацій має на меті забезпечити належний їх стан, та в подальшому відповідну якість цільового продукту. Ця стадія складається з мийки обладнання та комунікацій, перевірки їх на герметичність та стерилізацію. Для належного стану обладнання проводять мікробіологічний контроль.

ДР 1.5.1. Мийка обладнання та комунікацій

Обладнання, що безпосередньо контактує з речовинами проходить етап мийки синтетичними миючими засобами та дезінфікуючими розчинами при температурі 50-60 °С. Знімні частини обладнання розбирають, знімають та миють розчином миючого засобу при такому самому інтервалі температур.

ДР 1.5.2. Ополіскування обладнання

					ДП 6210. 00. 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		48

Після миття об'єктів одним з вищезазначених мийних засобів необхідно повністю видалити залишки забруднень і розчину мийного засобу з оброблених поверхонь за допомогою промивання об'єктів водою.

ДР 1.5.3 Перевірка на герметичність

Перевірка на герметичність апарату здійснюється шляхом створення в ньому тиску 0,2 МПа та витримці протягом визначеного часу. Якщо перевірка на герметичність показала позитивний результат – процес завершують стадією стерилізації.

ДР 1.5.4. Стерилізація

Обладнання та комунікації стерилізують гострою парою під тиском, яка вводиться безпосередньо в апарат. Стерилізують при температурі 140⁰С, тиску 0,2 МПа, протягом 90 хв. Після закінчення стерилізації для забезпечення та підтримки асептичності, зокрема для ферментера, до апарата через барботер подають стерильне повітря, підтримуючи тиск 0,02-0,03 МПа [56].

ДР 2. Підготовка повітря

ДР 2.1 Підготовка вентиляційного повітря

Для системи подачі вентиляційного повітря для виробничих приміщень чистоти відповідного класу застосовується не однонаправлений повітряний потік. Повітря подається системою кондиціонування через встановлені розподільники повітря. Усередині приміщення додатково встановлювати пересувні рециркуляційні повітроочисники для забезпечення швидкого та ефективного очищення повітря за рахунок механічної фільтрації [57].

Очищення припливного повітря має бути ступінчастим, а кількість рівнів очищення обумовлюється необхідною чистотою повітряного середовища приміщення, що забезпечується використанням фільтрів визначеної ефективності.

ДР 2.1.1. Забір повітря з атмосфери

					ДП 6210. 00. 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		49

Для визначення місця забору повітря із зовнішнього середовища необхідне врахування існуючих та можливих джерел аерозольних та газоподібних забруднень. Відповідно до цього, забір повітря проводиться з атмосфери з використанням трубчатих конструкцій висотою 8-10 м у місцях із мінімальною запиленістю та загазованістю.

ДР 2.1.2 Механічна очистка повітря

Попередня очистка повітря від механічних контамінантів має на меті видалення аерозольних механічних часток та запобігання абразивному пошкодженню компресійної апаратури. На цьому етапі використовують фільтри попередньої очистки, встановлюючи їх перед вентиляторами. Таким чином попереджається потрапляння часток розміром більше 5 мкм.

ДР 2.1.3. Регулювання та стабілізація термодинамічних показників повітря

У системі повітропостачання за допомогою компресора відбувається нагнітання повітря, внаслідок чого воно набуває високих температур. При виході необхідне його охолодження до визначеної температури, що забезпечується наявністю теплообмінника. Крапельна волога, що утворюється під час охолодження уловлюється та у вигляді конденсату виводиться у каналізацію.

ДР 2.1.4. Очистка повітря на головному фільтрі

На даному етапі використовується повітряний фільтр класу HEPA, при використанні якого можливе проведення очистки повітря від часток розміром $> 1,5$ мкм з ефективністю до 98% [58].

ДР 2.2 Підготовка технологічного повітря

У біотехнологічному виробництві досить високі вимоги до ступеня очищення технологічного повітря, що подається для аерації при культивуванні продуцентів біологічно активних речовин, оскільки необхідною вимогою є зниження рівня можливої контамінації. Таким чином, для процесу очистки технологічного повітря основними стадіями так само є ДР 2.1.1, ДР 2.1.2, ДР 2.1.3 та ДР 2.1.4, але ефективність останньої не є

					ДП 6210. 00. 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		50

достатньою у зв'язку з чим є необхідним проведення очистки на індивідуальному фільтрі.

ДР 2.2.5.Очистка повітря на індивідуальному фільтрі

Індивідуальний фільтр забезпечує вловлювання часток, пропущених при роботі інших фільтрів, а також часток, що потрапили до системи випадково та мають розмір $> 0,3$ мкм. Ці фільтри здатні забезпечити ефективність значенням 99,99999% [58].

ДР 3. Підготовка поживного середовища

Процес підготовки поживного середовища є важливим етапом виробництва, оскільки якість приготованого середовища визначає подальші процеси отримання посівного матеріалу, та, безпосередньо, цільового продукту у результаті виробничого культивування. До основних вимог, що висувають компонентному складу поживного середовища є доступність, дешевизна, хороша засвоюваність продуцентом та здатність до забезпечення його основними джерелами вуглецю та азоту.

У даному виробництві процес отримання посівного матеріалу в качалкових колбах і посівному апараті та, безпосередньо, виробничого культивування у ферментері проводять на комплексному середовищі, що включає наступні компоненти, мас. % :

- Меляса - 3,0 ;
- Амоній азотнокислий – 0,3 ;
- Калій фосфорнокислий однозаміщений - 0,12 ;
- Сечовина – 0,07 ;
- Вода питна – інше [22].

У даному проекті для культивування гриба *T. pubescens* 923-2, основним компонентом поживного середовища, у якості джерела вуглецевого субстрату, слугує меляса. Ряд досліджень підтверджує доцільність її використання в даному випадку у зв'язку з задовільними показниками росту на ній та вигідністю з економічної точки зору. Для

					ДП 6210. 00. 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		51

отримання кінцевого продукту належної якості вміст редукуючих речовин в мелясі має бути на рівні 43 %.

Компонентний склад даної сировини включає в себе цукри, що призводить до необхідності стерилізувати її окремо від сольових компонентів, тобто підготовкою в інших реакторах. Окрім цього, складовою середовища є також сечовина, яка у зв'язку з її термолабільними властивостями, додається до поживного середовища після стерилізуючої фільтрації. Для відновлення музейної культури на чашках Петрі, використовують поживне середовище, приготоване в умовах лабораторії.

ДР 3.1. Приготування розчину меляси

До реактора через об'ємно-ваговий дозатор подається меляса, що попередньо була досліджена на вміст у ній редукуючих речовин, значення якого має бути близько 43% для даного об'єму поживного середовища. Сюди ж потім порційно додається вода. При перемішуванні і нагріванні готується розчин температури 80°C.

ДР 3.2. Стерилізація розчину

Отриманий розчин піддають періодичній стерилізації шляхом нагріву глухою парою при тиску 0,2 МПа до температури 120 – 122°C . Після стерилізації розчин подається для приготування поживного середовища у відповідні реактори.

ДР 3.3. Приготування розчину солей

Через об'ємно-ваговий дозатор до реактора зі змішуючим пристроєм подаються калій фосфат однозаміщений, амоній азотнокислий та вода. Компоненти розчиняються при перемішуванні.

ДР 3.4. Стерилізація розчину солей

Стерилізацію приготованого розчину проводять за температури 120 - 130 °C Протягом 40 хв при тиску 0,2 МПа. По завершенню стерилізації, розчин передається до посівного апарата чи ферментера під тиском шляхом передавлювання.

ДР 3.5. Приготування розчину сечовини

					ДП 6210. 00. 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		52

Сечовину через дозатор подають до реактора зі змішуючим пристроєм, а також подають воду для приготування розчину. Процес відбувається при перемішуванні. Приготований розчин через тканинний фільтр передають на стадію стерилізації.

ДР 3.6. Стерилізація розчину

У зв'язку з термолабільністю компоненту, для стерилізації використовують метод фільтрації при пропусканні розчину через азбестоцелюлозний мембранний фільтр ($d = 0,22$ мкм) [56].

ДР 3.7 Приготування розчинів для корегування рН

Для отримання необхідного значення рН поживного середовища на виробництві готують розчини кислоти та лугу для його регулювання.

ДР.3.7.1 Приготування розчину лугу

Необхідна концентрація розчину лугу, що використовується для регулювання рН становить 20%. Для цього в реактор вносять визначену наважку гідроксиду натрію і доводять водопровідною водою до відповідного об'єму.

ДР 3.7.2 Приготування розчину кислоти

Для регулювання рН потрібен також кислий розчин, що представлений 2н розчином сульфатної кислоти, що готується шляхом її розведення водою в реакторі до необхідної концентрації.

ДР 4. Підготовка піногасника

У якості піногасника для процесів підготовки посівного матеріалу в посівному апараті та культивування у ферментері використовується пропінол, що вводиться в кількості 0,05 % до поживного середовища. Стерилізація його здійснюється при нагріванні протягом 2 годин при температурному режимі 125-128°C. Після охолодження піногасника, він по мірі потреби використовується в процесах культивування.

ДР. 5 Підготовка посівного матеріалу

ДР 5.1. Відновлення музейної культури

					ДП 6210. 00. 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		53

Відновлення музейної культури *T. rubescens* 923-2 проводять шляхом перенесення музейної культури на скошений агар, здійснюючи культивування на поживному середовищі протягом шести діб при температурі $27 \pm 1^\circ\text{C}$. Основою поживного середовища на даному етапі є ячмінно-солодовий екстракт із додаванням до нього агару в концентрації 20 г/л.

ДР 5.2. Вирощування культури в колбах

Отриманий на попередньому етапі посівний матеріал переносять з агаризованого середовища на рідке мелясне та проводять культивування в качалкових колбах. Процес триває протягом 96 год за температури $27 \pm 1^\circ\text{C}$ при частоті обертання качалки 180 об/хв.

ДР 5.3. Вирощування культури в посівному апараті

Для культивування продуцента в посівному апараті використовували посівний матеріал із колб та вносили його до поживного середовища реактора, куди попередньо були додані компоненти поживного середовища зі стадії ДР 4, об'ємом 250 дм^3 у кількості 5 дм^3 . Тривалість культивування складає 48 год при механічному перемішуванні з частотою 140 об/хв та аерації $1\text{ дм}^3/\text{дм}^3\cdot\text{хв}$. Температура проведення процесу $27 \pm 1^\circ\text{C}$ при рН 5,8-6,2 та тиску 0,03-0,05 МПа.

ТП 6 Виробниче культивування

Із посівного апарату вирощену культуру передають для засіву основного виробничого ферментера об'ємом 10 м^3 із коефіцієнтом заповнення 0,7. Сюди також вносять приготовані на попередніх стадіях компоненти поживного середовища, та піногасник за потребою.

Процес культивування проходить протягом 40 год при температурі $27 \pm 1^\circ\text{C}$ та аерації $1\text{ м}^3/\text{м}^3\cdot\text{хв}$ при тиску 0,03-0,05 МПа з частотою перемішування 12 об/хв. Накопичення біомаси за абсолютно сухою речовиною складає 7-8 г/л середовища. Показником для завершення процесу біосинтезу є вміст редуруючих речовин в поживному середовищі наприкінці процесу, що складає близько 0,01% [15].

					ДП 6210. 00. 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		54

ТП 7 Відділення біомаси від культуральної рідини

Після завершення процесу культивування, біомасу передають на фільтр для відділення міцелію. У даному випадку використовують фільтр-прес, що дозволяє здійснити віджим біомаси та її промивку без залучення додаткового обладнання. Площа фільтрування складає 10 м² із товщиною шару біомаси на фільтрі – 2 см. У результаті, після промивки відділеного міцелію, отримують продукт із значенням вологості близько 75-80%.

ТП 8 Сушіння біомаси

Характеристика кінцевої форми продукту (сухої міцеліальної маси) у даному виробництві, дає можливість вибору технології сушіння продукту в сушарці псевдозрідженого шару. Процес здійснюють при середній температурі 70°C , що забезпечує утворення продукту вологістю не більше 7%.

ТП 9 Подрібнення міцеліальної біомаси

Отриману суху міцеліальну біомасу далі піддають процесу потрібнення на молотковій дробарці для отримання часток розміром близько 0,5 мм, після чого отриманий продукт відправляють на стадію пакування.

ПМВ 10 Фасування та пакування продукту

ПМВ 10.1. Фасування продукту в пакети

Готову висушену та подрібнену міцеліальну біомасу фасують в поліетиленові пакети масою по 5 кг [54].

ПМВ 10.2 Маркування та пакування готового продукту

Після наповнення пакетів їх маркують шляхом нанесення етикеток. Марковані наповнені поліетиленові пакети пакують у групову тару, представлену картонними коробками, та відправляють на зберігання.

ПВ 11 Переробка відходів

На стадії переробки відходів відбувається відновлення фільтрувальних матеріалів, що надходять з кількох стадій виробництва, шляхом обробки їх гарячою водою та дезінфікуючими засобами.

ЗВ 12 Знешкодження відходів та викидів

					ДП 6210. 00. 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		55

Під час виробництва утворюється велика кількість відходів, які знешкоджуються на даному етапі належним чином для забезпечення екологічної чистоти цільового продукту. Таким чином, метою даної стадії є знешкодження відходів та викидів, представлених відпрацьованими рідинами, повітряними викидами та твердими відходами, а саме некондиційним посівним матеріалом та промивними водами, вентиляційним та технологічним повітрям при їх викидах в атмосферу, партіями бракованого препарату, залишками пакувальних матеріалів тощо.

4.4 Матеріальний баланс

У даному виробництві готовою формою продукту виступає суха міцеліальна маса, розфасована в пакети. Відповідно до даних [15], накопичення цільового продукту складає 7-8 г/л, що після здійснення основних стадій технологічного процесу та пакування дає змогу отримати готовий продукт кількості 10 пакетів. Матеріальний баланс на виробництво представлений у табл. 4.3.

Таблиця 4.3. Матеріальний баланс виробництва

Використано				Отримано			
Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Кількість			Назва кінцевого продукту або напівпродукту, відходів та втрат	Кількість		
	кг	л	шт		кг	л	шт
1	2	3	4	5	6	7	8
ТП 6							
Поживне середовище від ДР 3		6845		Культуральна рідина		6650	
Посівний матеріал від ДР 5		155		Втрати з виносом повітря (5%)		350	
Всього :	7000			Всього :	7000		
ТП 7							

Продовження Таблиці 4.3

Культуральна рідина		6650		Волога міцеліальна біомаса	340		
				Фільтрат		6110	
				Втрати (3%)		200	
Всього :	6720			Всього :	6720		
ТП 8							
Волога міцеліальна біомаса	340			Суха міцеліальна маса	52		
				Волога	278		
				Втрати (3%)	10		
Всього :	340			Всього :	340		
ТП 9							
Суха міцеліальна маса	52			Подрібнена міцеліальна маса	52		
				Втрати (3%)			
Всього :	52			Всього :	52		
ПМВ 10							
Подрібнена міцеліальна маса	50,5			Розфасований та упакований готовий продукт	50		10
Пакети			10	Втрати при фасуванні (1%)	0,5		2
Коробки			2				
Всього :	62,5			Всього :	62,5		

4.5. Контроль виробництва

Для отримання готового продукту належної якості, показники якої наведено вище, необхідним є здійснення контролю виробництва. Основні контрольні точки, об'єкти, показники та їх нормативні характеристики наведені в табл. 4.4.

Таблиця 4.4. Контроль виробництва

Назва стадії та номер контрольної точки	Об'єкт контролю та показник, що вивчається	Метод контролю	Періодичність перевірки	Нормативна характеристика показника
---	--	----------------	-------------------------	-------------------------------------

1	2	3	4	5
ДР 1.2.1 приготування розчину миючих засобів Кт, Кх	Концентрація розчину	Мірний посуд, ваги, візуально	Кожної операції	1-2%
ДР 1.2.2 Приготування розчину етилового спирту 76% Кт, Кх	Концентрація розчину	Мірний посуд	Кожну операцію	76 %
ДР 1.2.3 Приготування розчину перекису водню 6% Кт, Кх	Концентрація розчину	Мірний посуд	Кожну операцію	6%
ДР 1.3. Підготовка виробничих приміщень Кт, Км	Запиленість приміщення, показник мікробіологічної чистоти повітря	Візуально, мікробіологічний аналіз	Кожну операцію	Норма відхилення 5%
ДР 1.4.1 Мийка обладнання та комунікацій Км, Кт	Мікробіологічна чистота обладнання та комунікацій	Метод змивів	Не рідше одного разу на місяць після дезінфекції	Не рідше одного разу на місяць після дезінфекції
ДР 1.4.3 Перевірка обладнання на герметичність Кт	Герметичність обладнання	Манометр	Кожну операцію	Відсутність зниження тиску протягом 30 хв
ДР 1.4.4 Стерилізація обладнання та	Тиск	Манометр	Протягом процесу	0,2 МПа
	Час стерилізації	Годинник	Протягом процесу	90 хв

комунікацій Кт, Км	Температура	Термоелектр ичний датчик	Протягом процесу	130°C
ДР 2. Підготовка повітря Кт, Км	Мікробіоло- гічна чистота	висів на чашки Петрі	Перед початком виробничого процесу	≤ 200 од/м ³
ДР 3.1 Приготуван- ня розчину меляси Кт, Кх	Вміст редуючих речовин, концентрація	Метод Бертрана, ваги, мірний посуд	Кожну операцію	43% Масова частка меляси - 3%
ДР 3.2 Стерилізація розчину Кт, Км	Мікробіоло- гічна чистота	Мікробіологі чний метод (висів на чашки Петрі)	Кожну операцію	Відсутність контаміантів
ДР 3.3 Приготуван- ня розчину солей Кт, Кх	Концентра- ція	Ваги, мірний посуд	Кожну операцію	Масова частка KН ₂ РO ₄ – 0,12% NН ₄ NO ₃ – 0,3%
ДР 3.4 Стерилізація розчину солей Кт, Км	Мікробіоло- гічна чистота	Мікробіологі чний метод (висів на чашки Петрі)	Кожну операцію	Відсутність контаміантів
ДР 3.5 Приготуванн я розчину сечовини Кт, Кх	Концентра- ція	Ваги, мірний посуд	Кожну операцію	Масова частка сечовини - 0,07%
ДР 4 Підготовка піногасника Кт, Км	Мікробіоло- гічна чистота	Мікробіологі чний метод (висів на чашки Петрі)	Кожної операції	Відсутність контаміантів
ДР 5.3 Підготовка посівного матеріалу Кт, Км	рН середовища, температура, концентрація біомаси, контамінація чужорідною мікрофлорою	рН-метр, термометр технічний, ваговий метод, висів на чашки Петрі	Кожні 24 год	рН= 5,8-6,2 Т=27±1°C 5 г/л Відсутність контаміантів

ТП 6 Виробниче культивуван ня Кт, Км, Кх	Температура процесу, час, рН середовища, вміст редуючих речовин, концентрація біомаси, концентрація глюканів, тиск, число обертів мішалки контамінація чужорідною мікрофлорою	Термометр технічний, годинник, рН-метр, метод Бертрана, гравіметрич- ний метод, антроновий метод, тахометр, висів на чашки Петрі	Кожні 24 год	$T=27\pm 1^{\circ}\text{C}$ 40 год $\text{pH}= 5,8-6,2$ 0,01% 7-8 г/л 0,11-1,12 г/л $P=0,03-0,05$ МПа $n=120$ об/хв Відсутність контаміантів
ТП 8 Сушіння біомаси Кт	Температура	Термометр технічний	Кожну операцію	70°C
ТП 9 Подрібнення міцеліальної біомаси Кт	Здрібненість	Просіювання	Кожну операцію	$d_{\text{часток}} < 0,5 \text{ мм}$
ПМВ 10 Пакування та маркування готового продукту Кт	Цілісність упаковки, вага фасованих продуктів	Візуально, ваги	Кожну операцію	Маса пакета – 5 кг

5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

5.1. Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату

У біотехнологічному виробництві реактори використовуються на різних етапах : на стадіях допоміжних робіт, в основному технологічному процесі, етапах обробки цільового продукту. Для даного проекту використовується ферментер на стадії виробничого культивування біомаси *Trametes pubescens* 923-2. Цільовий продукт в даному випадку отримують за рахунок проведення процесу в режимі глибинного культивування у ферментері визначного об'єму при механічному перемішуванні та аерації [22].

Процес глибинного культивування дозволяє значно більше контролювати процеси біосинтезу, однак, потребує досить тонкого регулювання шляхом підтримки оптимальних показників (температури, рН, тиску, тривалості культивування та ін.). Таким чином, вибір конструкції апарату визначається фенотипічними ознаками біологічного агента для його оптимального використання в процесі біосинтезу для отримання цільового продукту [56]. Оптимальними умовами для росту *Trametes pubescens* 923-2 є наступні :

- Температура культивування - 27 ± 1 °C ;
- Інтенсивність перемішування – 120 об/с ;
- Аерація – $1\text{м}^3/1\text{м}^3\cdot\text{хв.}$

Таким чином, для здійснення процесу культивування необхідно використати апарат для глибинного аеробного культивування з перемішуючим пристроєм. Групу ферментерів з механічними

					ДП 6210. 00. 000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробив		Макогін О.О.			РОЗДІЛ 5. Розрахунок обладнання для проведення технологічного процесу	Стадія	Аркуш
Консульт.		Фесенко С.В.				Д	61
						КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ	
Керівник		Тимова Л.О.					
Затвер.							
						Аркуш	86

перемішуючими пристроями, як правило, використовують найчастіше, оскільки вони характеризуються властивістю до нескладної зміни технологічних параметрів та ефективної доставки кисню і поживних речовин до біологічних агентів, що визначають їх характер розвитку та біосинтетичну активність. Для таких ферментерів подача повітря до культурального середовища відбувається за допомогою барботера, що являє собою кільце з отворами. Внаслідок цього, відбувається утворення дрібних бульбашок повітря, а за рахунок механічного перемішування – їх рівномірний розподіл. Для забезпечення останнього необхідна наявність мішалки – однієї, або кількох (в залежності від апарату) [59]. Перемішуючі пристрої – мішалки, в залежності від конструкцій поділяють на турбінні, лопатеві, якірні, рамні та пропелерні.

Культуральна рідина міцеліальної культури являє собою трифазну систему, до складу якої входить рідина, газ та тверде тіло, та є досить мінливою в ході процесу за показниками реологічних властивостей. У світовій практиці для таких систем часто використовуваними є мішалки турбінного типу з прямим або вигнутими лопатями для забезпечення радіального потоку рідин. [61]. Оскільки при введенні значної кількості повітря, в апараті утворюється газорідинна система із високим вмістом кисню, то для інтенсивного перемішування цієї системи, що прискорить сорбцію кисню необхідна значна циркуляція, що найкращим чином забезпечується використанням знову ж таки турбінної мішалки [62].

Для аерації поживного середовища в реакторі використовують такий конструктивний елемент як барботер. Для процесу культивування згідно з технологією обрано кільцеву його конструкцію [15], що у поєднанні з турбінною мішалкою забезпечить належний розподіл кисню в середовищі [63].

Таким чином, у результаті аналізу літературних даних та типового технологічного рішення для виробництва цільового продукту у якості ферментера було обрано апарат, що являє собою вертикальну місткість із

					ДП 6210. 00. 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		62

циліндричною обичайкою, еліптичними днищем та кришкою, обладнаний турбінною мішалкою відкритого типу та кільцевим барботером (рис. 5.1).

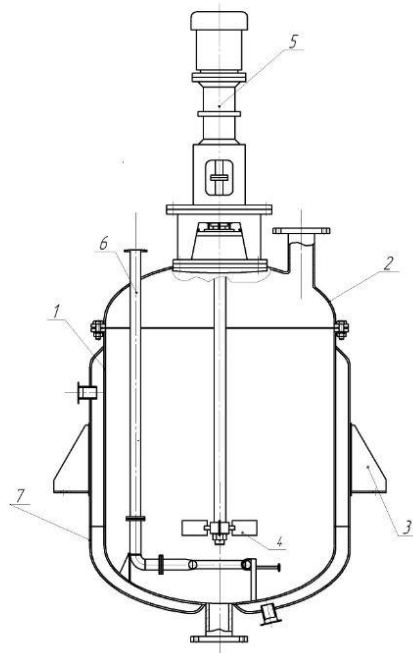


Рисунок 5.1. Схема ферментера: 1 – корпус, 2 – кришка, 3 – опори, 4 – мішалка, 5 – привод, 6 – барботер, 7 – сорочка [60]

Підбір матеріалів для даної конструкції повинен виконувати вимоги кислотостійкості, бути антикорозійним та хімічно інертним. Це пов'язано з тим, що середовище всередині апарату має рН 5,8-6,2 – тобто слабкокислое. Таким чином, матеріалом для виготовлення конструкції обирають неіржавіючу сталь високолегованих марок для забезпечення якості цільового продукту в процесі виробництва. У зв'язку з цим, матеріалом для обраного апарата є сталь X18H10T.

5.2. Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки

Вихідні дані для розрахунку :

1. Об'єм апарата : $V=10 \text{ м}^3$
2. Коефіцієнт заповнення : $K_3 = 0,7$

					ДП 6210. 00. 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		63

3. Час культивування : $\tau = 40$ год
4. Температура культивування : $T = 28^{\circ}\text{C}$
5. Процес аеробний, аерація : $1 \text{ м}^3/\text{м}^3 \cdot \text{хв}$
6. Тип перемішуючого пристрою – відкрита турбінна мішалка .

Конструктивний розрахунок

Метою розрахунку є визначення розмірів виробничого ферментера та його основних конструктивних елементів.

Визначаємо робочий об'єм апарата [60] :

$$V_p = V_n \cdot K_3 \quad (5.1)$$

$$V_p = 10 \cdot 0,7 = 7 \text{ (м}^3\text{)}$$

На основі розрахованого об'єму апарата, відповідно до ГОСТ 6533-78, було обрано конструкцію з еліптичним днищем та еліптичною знімною кришкою, що відповідає типу 0. Відповідно до цього, внутрішній діаметр апарата (D) дорівнює 2200 мм (2,2 м).

Висота еліптичного днища за ГОСТ 6533-78 для апарата вказаного діаметра розраховується як :

$$h_8 = 0,2 \cdot D \quad (5.2)$$

$$h_8 = 0,2 \cdot 2,2 = 0,44 \text{ (м)}$$

Відповідно до вище згаданого стандарту, інші конструктивні розміри днища мають наступні значення :

Внутрішня поверхня еліптичного днища : $F_{\text{вн.дн.}} = 5,11 \text{ м}^2$

Висота відбортаної частини : $h_1 = 40 \text{ мм} = 0,04 \text{ м}$

Товщина стінки днища : $s = 10 \text{ мм} = 0,01 \text{ м}$

Об'єм еліптичного днища : $V_{\text{дн}} = 1,2637 \text{ м}^3$

Висота апарата : $H = 2980 \text{ мм} = 2,980 \text{ м}$

					<i>ДП 6210. 00. 000 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		64

Площа поверхні теплообміну рубашки : $F_p = 20,0 \text{ м}^2$

Маса днища : $m = 404,6 \text{ кг}$

Таким чином, визначаємо повну висоту днища апарату за формулою [60] :

$$h_{\text{дн}} = h_1 + h_{\text{в}} \quad (5.3)$$

$$h_{\text{дн}} = 0,04 + 0,44 = 0,48 \text{ (м)}$$

Далі визначаємо об'єм циліндричної частини ферментера[60] :

$$V_{\text{ц}} = V_{\text{н}} - 2V_{\text{дн}} \quad (5.4)$$

$$V_{\text{ц}} = 10 - 2 \cdot 1,237 = 7,526 \text{ (м}^3\text{)}$$

Висота циліндричної частини ферментера [60] :

$$H_{\text{ц}} = \frac{V_{\text{ц}}}{F} = \frac{7,526 \cdot 4}{3,14 \cdot 2,2^2} = 1,98 \text{ (м)} \quad (5.5)$$

Висота рівня рідини в апараті визначається за формулою [60] :

$$H_p = \frac{4(V_p - V_{\text{дн}})}{\pi D^2} + h_1 + h_{\text{в}} \quad (5.6)$$

$$H_p = \frac{4(7 - 1,237)}{\pi \cdot 2,2^2} + 0,04 + 0,440 = 1,997 \text{ (м)}$$

Розрахунок механічного перемішуючого пристрою

Для перемішування середовища в реакторі обираємо відкриту турбінну мішалку, параметри якої відповідно до ГОСТ 20680-75 складають :

$$D/d_{\text{м}} = 3 \div 4$$

$$h_{\text{м}}/d_{\text{м}} = 0,2$$

$$h/d_{\text{м}} = 0,4 \div 1$$

$$1/d = 0,25$$

					ДП 6210. 00. 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		65

$$b/d_M = 0,1$$

$$\xi_M = 8,4$$

$$\frac{D}{4} \div \frac{D}{3} = \frac{2,2}{4} \div \frac{2,2}{3} \quad (5.7)$$

Серед вирахованого діапазону значень (0,55 ÷ 0,73) відповідно до ГОСТ обираємо діаметр мішалки 0,71 м

$$d_M = 710 \text{ мм} = 0,71 \text{ м}$$

Таким чином, визначаємо основні параметри мішалки:

$$\text{Висота перемішуючого пристрою : } h_M = 0,2 \cdot d_M = 0,2 \cdot 0,71 = 0,142 \text{ (м)} \quad (5.8)$$

$$\text{Висота розміщення мішалки : } h = 0,4 \cdot d_M = 0,4 \cdot 0,71 = 0,284 \text{ (м)} \quad (5.9)$$

$$\text{Коефіцієнт гідравлічного опору мішалки: } \xi_M = 8,4$$

Число обертів мішалки згідно з обраною технологією – 120 об/хв

$$n = 120 \text{ об/хв} = 2 \text{ об/с} \quad (5.10)$$

Розрахунок глибини воронки

Визначаємо висоту параметра завантаження апарата – γ за формулою [64] :

$$\gamma = 8 \frac{H_p}{D} + 1 \quad (5.11)$$

$$\gamma = 8 \cdot \frac{1,997}{2,2} + 1 = 8,27$$

Параметр гідравлічного опору мішалки E розраховуємо з формули [64] :

$$E = \frac{\gamma}{\xi_M z_M R_{\text{ец}}^{0,25}} \quad (5.12)$$

$$E = \frac{8,27}{8,4 \cdot 1 \cdot (571793)^{0,25}} = 0,036$$

За знайденим параметром відповідно до графіка, наведеного в літературі [60] визначаємо параметр розподілення швидкості ψ_1 :

$$\psi_1 = -0,3,$$

тоді параметр глибини воронки В дорівнює:

$$B = 9$$

Знаходимо глибину воронки за формулою [60]:

$$h_B = \frac{Bn^2 d_M^2}{2} \quad (5.13)$$

$$h_B = \frac{9 \cdot 2^2 \cdot 0,71^2}{2} = 9,07 \text{ (м)}$$

Гранично допустима глибина воронки [60]:

$$h_{гр} = H_p - h = 1,997 - 0,284 = 1,713 \text{ (м)} \quad (5.14)$$

Перевіряємо співвідношення:

$$h_B > h_{гр} \quad (5.15)$$

$9,07 > 1,713$, отже, у такому випадку, встановлюються перегородки.

Розрахунок барботера

Проведемо розрахунок геометричних розмірів барботера. Висота перемішуючого пристрою над барботером дорівнює:

$$h_6 = 0,25 d_M \quad (5.16)$$

$$h_6 = 0,25 \cdot 0,71 = 0,178 \text{ (м)}$$

Діаметр барботеру знаходимо зі співвідношення:

$$D_0 = (0,5 : 0,75) d_M \quad (5.17)$$

$$D_0 = 0,75 \cdot 0,71 = 0,532 \text{ (м)}$$

Приймаємо діаметр отворів барботера 3 мм :

$$d_0 = 3 \text{ мм} = 0,003 \text{ м}$$

Кількість отворів у барботері :

$$Z_{\text{отв}} = \frac{4V_{\Gamma}}{\pi d_0^2 W_0} \quad (5.18)$$

$$Z_{\text{отв}} = \frac{4 \cdot 0,01667}{3,14 \cdot 0,003^2 \cdot 30} = 80 \text{ отворів}$$

Кількість отворів в одному ряду дорівнює [64] :

$$Z_{\text{отв}1} = \frac{\pi D_0}{t_{\text{отв}}} \quad (5.19)$$

$$Z_{\text{отв}} = \frac{3,14 \cdot 0,532}{0,01} = 167 \text{ отворів}$$

Сума поперечного перерізу отворів барботера [64]:

$$S_{\text{отв}} = \frac{\pi d_0^2}{4} \cdot Z_{\text{отв}} \quad (5.20)$$

$$S_{\text{отв}} = \frac{3,14 \cdot 0,003^2 \cdot 80}{4} = 0,57 \cdot 10^{-3} \text{ м}^2$$

Розрахунок потужності, що витрачається на перемішування

Потужність, що витрачається на перемішування визначають за формулою [64]:

$$N_{\text{м}} = K_N \cdot \rho_c \cdot n^3 \cdot d_{\text{м}}^5, \quad (5.21)$$

де K_N – критерій потужності, що залежить від інтенсивності перемішування і характеризується центробіжним критерієм Рейнольдса:

$$Re_{\text{ц}} = \frac{\rho_c \cdot n \cdot d_{\text{м}}^2}{\mu_c}; \quad (5.22)$$

$$Re_{\text{ц}} = \frac{1055 \cdot 2 \cdot 0,71^2}{1,3 \cdot 10^{-3}} = 81,8 \cdot 10^4.$$

Із графіка, $K_N = 0,8$, тоді

$$N_M = 0,8 \cdot 1055 \cdot 2^3 \cdot 0,71^5 = 1218 \text{ (Вт)} \quad (5.23)$$

Тепловий розрахунок

Метою теплового розрахунку є визначення необхідної площі теплообміну та перевірка, чи забезпечить стандартна площа теплообміну сорочки заданий температурний режим процесу культивування. Надходження енергії до ферментера відбувається з поживним середовищем, із посівним матеріалом, із повітрям, шляхом дисипації механічної енергії від перемішуючих пристроїв та теплоти реакцій, що протікають у ферментері, таким чином, сумарна кількість надходжень теплоти має вигляд :

$$\sum E_{\text{надх}} = E_{\text{пс}} + E_{\text{пм}} + E_{\text{пов}} + E_{\text{дис}_1} + E_p \quad (5.24)$$

Розрахуємо кожен складову [65]

- Поживне середовище

$$E_{\text{пс}} = M_c \cdot C_c \cdot t_c = \rho_c \cdot V_p \cdot 0,9 \cdot C_c \cdot t_c \quad (5.25)$$

$$E_{\text{пс}} = 1055 \cdot 7 \cdot 0,98 \cdot 3789 \cdot 28 = 767,8 \text{ (МДж)}$$

- Посівний матеріал

$$E_{\text{пс}} = M_c \cdot C_c \cdot t_c = \rho_c \cdot V_p \cdot 0,9 \cdot C_c \cdot t_c \quad (5.26)$$

$$E_{\text{пм}} = 1062 \cdot 7 \cdot 0,02 \cdot 3789 \cdot 28 = 15,77 \text{ (МДж)}$$

- З повітрям

$$E_{\text{пов1}} = \rho_{\text{пов}} \cdot V_{\text{пов}} \cdot \tau \cdot C_{\text{пов}} \cdot t_{\text{пов}} \quad (5.27)$$

$$E_{\text{пов1}} = 1,175 \cdot 0,01667 \cdot 144\,000 \cdot 1000 \cdot 28 = 78,98 \text{ (МДж)}$$

- Теплота, що виділяється в результаті дисипації механічної енергії від перемішуючих пристроїв :

$$E_{\text{дис}} = N_M \cdot \tau_{\text{пр}} \quad (5.28)$$

					ДП 6210. 00. 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		69

$$E_{\text{дис}} = 1218 \cdot 144000 = 175,39 \text{ (МДж)}$$

- Теплота реакції, що протікає у ферментері :

$$E_p = m_{\text{цук}} \cdot r_{\text{цук}} \quad (5.29)$$

$$m_{\text{цук}} = 0,02 \cdot 0,9 \cdot V_p \cdot \rho_c \quad (5.30)$$

$$E_p = 0,02 \cdot 0,98 \cdot 7 \cdot 1055 \cdot 0,9 = 130,3 \text{ (МДж)}$$

Таким чином, сумарна кількість теплоти надходжень до ферментеру :

$$\sum E_{\text{надх}} = 767,8 + 15,77 + 78,98 + 175,39 + 130,3 = 1168,25 \text{ МДж}$$

Витрати теплової енергії відбуваються :

- з повітрям :

$$E_{\text{пов}_2} = 1,175 \cdot 0,0167 \cdot 3600 \cdot 1000 \cdot 28 = 1,98 \text{ МДж} \quad (5.31)$$

- З культуральною рідиною

$$E_{\text{пов}_2} = 1055 \cdot 7 \cdot 3879 \cdot 28 = 783,5 \text{ МДж}$$

- Втрати тепла в навколишнє середовище

$$E_{\text{втр}} = 0,02 \cdot (E_k + E_{\text{пов}_2}) \quad (5.32)$$

$$E_{\text{втр}} = 0,02 \cdot (783,5 + 1,98) = 15,71 \text{ МДж}$$

Таким чином, сума теплових витрат складає :

$$\sum E_{\text{витрат}} = 1,98 + 783,5 + 15,71 = 801,2 \text{ МДж}$$

Розраховуємо теплове навантаження у ферментері :

$$E_t = 801,2 - 1168,25 = - 367,06 \text{ МДж}$$

Дані розрахунку свідчать про те, що в апараті відбувається нагрівання, тому для підтримання температури необхідний процес охолодження.

Визначення середньої різниці температур

					ДП 6210. 00. 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		70

Визначення середньої різниці температур для режиму охолодження культуральної рідини в реакторі за умови відсутності зміни агрегатного стану середовищ [60]:

$$\Delta_{\text{cp}} = \frac{t_{H2} - t_{K2}}{\ln \frac{t_{H2} - \theta_H}{t_{K2} - \theta_H}} \cdot \frac{A - 1}{A \cdot \ln A} = \frac{32 - 28}{\ln \frac{32 - 18}{28 - 18}} \cdot \frac{1,6 - 1}{1,6 \cdot \ln 1,6} = 9,5^{\circ}\text{C} \quad (5.33)$$

$$\text{де } A = \frac{t_{K2} - \theta_H}{t_{K2} - \theta_K} = \frac{28 - 18}{28 - 22} = 1,6 \quad (5.34)$$

де $\theta_H = 18^{\circ}\text{C}$ і $\theta_K = 22^{\circ}\text{C}$ початкова і кінцева температури теплоносія відповідно, $^{\circ}\text{C}$;

$t_{H2} = 32^{\circ}\text{C}$ і $t_{K2} = 28^{\circ}\text{C}$ початкова і кінцева температури середовища в процесі охолодження.

Визначення коефіцієнту тепловіддачі середовища в реакторі

Коефіцієнт тепловіддачі від середовища в реакторі до стінки апарата або до змішувача, що визначається з рівняння [60]:

$$Nu_1 = C \cdot Re_{\text{ц}}^n \cdot Pr_1^{0,33} = 0,760 \cdot (81,8 \cdot 10^4)^{0,67} \cdot 10,821^{0,33} = 15263,9 \quad (5.35)$$

де коефіцієнти $C = 0,760$, $n = 0,67$ для апарату з сорочкою, перегородками та відкритою турбінною мішалкою.

Відцентровий критерій Рейнольдса становить [64]:

$$Re_{\text{ц}} = \frac{n \cdot d_M^2}{\nu} = \frac{\rho \cdot n \cdot d_M^2}{\mu} = \frac{1055 \cdot 2 \cdot 0,71^2}{1,3 \cdot 10^{-3}} = 81,8 \cdot 10^4 \quad (5.36)$$

Критерій Прандтля для середовища в апараті [60]:

$$Pr_1 = \frac{\mu_1 \cdot C_{p1}}{\lambda_1} = \frac{1,3 \cdot 10^{-3} \cdot 3879}{0,466} = 10,821 \quad (5.37)$$

Коефіцієнт тепловіддачі від середовища до стінки [60]:

					ДП 6210. 00. 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		71

$$\alpha_1 = \frac{Nu_1 \cdot \lambda_1}{D} = \frac{15263,9 \cdot 0,466}{2,2} = 3233 \frac{\text{Вт}}{\text{м}^2\text{К}} \quad (5.38)$$

Визначення коефіцієнта тепловіддачі теплоносія в сорочці

Коефіцієнт тепловіддачі теплоносія в сорочці знаходять за рівнянням [64]:

$$Nu_2 = C(Gr \cdot Pr)^n = 0,15(5,86 \cdot 10^{11})^{0,33} = 1146,83 \quad (5.39)$$

де коефіцієнти $C = 0,15$ і $n = 0,33$ знаходять в залежності від величини добутку $Gr \cdot Pr$:

у випадку, коли воду використовують як теплоносій [60]:

$$Gr \cdot Pr = H_p^3 \cdot \Delta t_1 \cdot B = 1,997^3 \cdot 4,75 \cdot 15,5 \cdot 10^9 = 5,86 \cdot 10^{11} \quad (5.40)$$

Фізичні властивості теплоносія знаходять за його середньої температури [60]:

$$\theta_{cp} = \frac{\theta_H + \theta_K}{2} = \frac{18 + 22}{2} = 20^\circ\text{C} \quad (5.41)$$

різниця температур:

$$\Delta t_1 \approx \frac{\Delta t_{cp}}{2} = \frac{9,5}{2} = 4,75 \quad (5.42)$$

Значення B для $20^\circ\text{C} = 15,5 \cdot 10^9$

Коефіцієнт тепловіддачі для води у сорочці становить [60]:

$$\alpha_2 = \frac{Nu_2 \cdot \lambda_2}{d} = \frac{1146,83 \cdot 0,599}{0,168} = 4088,99 \frac{\text{Вт}}{\text{м}^2\text{К}} \quad (5.43)$$

де d — еквівалентний діаметр каналу сорочки.

$$d_{\text{екв}} = \frac{2 \cdot a \cdot b}{a + b} = \frac{2 \cdot 0,21 \cdot 0,14}{0,21 + 0,14} = 0,168\text{м} \quad (5.44)$$

$$a = \frac{D_c - 2\delta_{cm} - D}{2} = \frac{2,64 - 2 \cdot 0,01 - 2,2}{2} = 0,21\text{м} \quad (5.45)$$

Коефіцієнт теплопередачі становить [60]:

					ДП 6210. 00. 000 ПЗ	Арк.
						72
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

$$K = \frac{1}{\frac{1}{\alpha_1} + \frac{\delta}{\lambda} + \frac{1}{\alpha_2}} = \frac{1}{\frac{1}{3233} + \frac{0,01}{17,5} + \frac{1}{4088,99}} = 888,654 \frac{\text{Вт}}{\text{м}^2\text{К}} \quad (5.46)$$

Тоді поверхня теплообміну становить [60]:

$$F = \frac{Q}{K \cdot \Delta t} \quad (5.47)$$

$$F = \frac{367,06 \cdot 10^6}{888,654 \cdot 9,5 \cdot 40 \cdot 3600} = 3,02 \text{ м}^2$$

Дійсна поверхня теплообміну [60]:

$$F_d = \pi \cdot D \cdot H_c = 3,14 \cdot 2,2 \cdot 1,557 = 10,756 \text{ м}^2 \quad (5.48)$$

$$H_c = H_p - H_{дн} = 1,997 - 0,44 = 1,557 \text{ м} \quad (5.49)$$

Таким чином, умови теплообміну виконуються, поверхня теплообміну сорочки апарату забезпечить заданий температурний режим протягом роботи.

5.3. Вибір загальнозаводського обладнання

Процес виробництва неможливий без здійснення чисельної кількості допоміжних операцій, що потребують відповідного обладнання. Правильність вибору останнього суттєво впливає на ефективність всього виробництва [64].

До допоміжного обладнання відносять реактори-змішувачі для поживних середовищ, резервуари для зберігання рідин, мірники, дозатори, а також насоси. Останні відіграють важливу роль при транспортуванні рідин для проведення процесу культивування [64].

Насоси являють собою обладнання, що призначене для створення постійного потоку рідини і за принципом дії поділяються на три основні великі групи: лопатеві, роторні та поршневі. Вибір типу насоса залежить від мети та властивостей середовища. При порівняно невеликих витратах та

					ДП 6210. 00. 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		73

висоті апарату доцільно обрати насос відцентрового типу [66]. При їх використанні повинна виконуватися умова уникнення контамінації культуральної рідини, а також викидів культуральної рідини до навколишнього середовища(тобто герметичність). Таким чином, варто обрати герметичний відцентровий насос типу ХГВ. Їх особливістю є відсутність сальникових або торцевих ущільнень, що і забезпечує усунення ймовірності контамінації рідини при подачі або відведенні. Окрім цього, підшипники змащуються перекачуваною рідиною, завдяки чому не відбувається забруднення змащувальними матеріалами [64].

5.4. Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища

При організації виробництва мікробіологічної промисловості мають враховуватися всі елементи праці на виробничих операціях, і в залежності від того, як об'єктивно вони будуть враховані – будуть залежати умови праці робітників. Охорона праці представляє собою систему законодавчих актів та відповідних їм соціально-економічних, технічних, гігієнічних та організаційних заходів, що спрямовані на забезпечення збереження здоров'я та працездатності людини в процесі роботи [67].

Підприємства біотехнологічної промисловості є виробництвами мікробіологічного та хімічного профілю, на яких широко застосовуються кислоти, луги, солі, а також мікроорганізми, що можуть стати причиною виникнення алергічних реакцій та ряду захворювань. Окрім цього, деякі використовувані у виробництві речовини можуть бути пожежо - та вибухонебезпечні, що зумовлює приділення значної уваги питанням охорони праці.

Для організації кожного робочого місця необхідно мати дані про виділення в ході виробництва шкідливих речовин, пилу, газів, шуму, вібрацій, а також склад обладнання, розміщення проходів та ін. Таким чином,

ці показники повинні відповідати відповідним нормативно-технічним документам.

На виробництві містяться ємності для зберігання легкозаймистих та горючих рідин (етанолу), безпечність зберігання яких забезпечується встановленням в резервуарах та цистернах дихальних клапанів, а також засобів захисту від пожежі. Особливих заходів вживають при зберіганні кислот та лугів [68].

Виробниче обладнання повинно відповідати вимогам безпеки трудової та виробничої діяльності при його використанні в умовах, що відповідають інструкціям та регламентам. Для запобігання утворення іскор, приводи мішалок, шестерні, а також підшипники валів виготовляють з відповідних матеріалів (алюмінію, міді, пластмаси). Загалом, обладнання виробництва повинне відповідати ГОСТ 12.2.003-91 для забезпечення загальних стандартів безпеки праці.

Основною умовою забезпечення безпеки роботи є дотримання технологічного регламенту проведення операцій на виробництві. У повітрі, що виділяється з інокуляторів та виробничих ферментерів міститься велика кількість мікроорганізмів, а також побічних речовин, тому воно потребує очистки. Таким чином, приміщення, де розміщене це обладнання підлягає герметизації. У процесі сушіння та подрібнення готового продукту виділяється значна кількість малих частинок порошку, що разом з повітрям створюють вогне- та вибухонебезпечні суміші. Таким чином, дробарки також повинні бути добре механізовані та герметизовані.

Окрім охорони праці, діяльність виробництва повинна бути спрямована також на раціональне використання природних ресурсів та охорону навколишнього середовища. Вирішення цієї задачі забезпечується наявністю установок очистки повітряних викидів, стічних та промивних вод [64].

Очистка технологічних повітряних викидів є однією із найбільш трудомісних задач. У виробництві такі викиди отримують на ділянках

					ДП 6210. 00. 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		75

сушіння, біосинтезу, в процесах вентиляції. Очистку цих викидів проводять в декілька ступенів [68].

Для попередження забруднення атмосфери основним заходом є герметизація виробничого обладнання, а також застосування різних типів одиничних і батарейних циклонів, гідроциклонів, пилоосаджувальних камер, тканинних та електричних фільтрів і скрубєрів [64]. Викиди від ферментерів містять живу мікрофлору, тому їх очистка досить важлива. Її здійснюють у фільтрах з попереднім охолодженням теплоносія, зниженням вологості на вологовідбійниках та наступних підігрівом для уникнення замочування фільтрів. Для очистки повітря, що виходить від вентиляційних систем використовують фільтри із волокнистих матеріалів. Окрім цього, у промисловості широко застосовуваними для очистки технологічних та вентиляційних викидів є абсорбери та адсорбери. Очищене повітря викидають через трубу розсіювання [64,68].

Технологічний процес отримання цільового продукту пов'язаний також із витратою великих кількостей води, які на виході являють собою рідини, що містять у своєму складі мінеральні солі, мікроорганізми органічні компоненти та інші сполуки. У зв'язку з цим, перед викидом до каналізації їх спочатку нейтралізують, а потім очищують від шкідливих речовин на очисних спорудах [68].

Забрудненість стічних вод оцінюють за двома показниками – хімічним споживанням кисню (ХСК) та біологічним споживанням кисню(БСК). У промислових умовах для очищення стоків застосовують декілька методів :

- механічний ;
- хімічний ;
- фізико-хімічний ;
- біологічний [68] .

ВИСНОВКИ

1. У проєкті для виробництва сухої міцеліальної біомаси на основі даних літературних джерел було обрано продуцент *Trametes pubescens* 923-2 із продуктивністю 7-8 г/дм³ біомаси та вмістом водорозчинних β-глюканів 0,11 г/дм³.

2. Враховуючи фізіолого-біохімічні особливості продуценту *T. pubescens* 923-2 обрано раціональний склад поживного середовища для виробничого біосинтезу на основі меляси, що включає в своєму складі амоній нітрат, калій фосфорнокислий однозаміщений та сечовину. Показано, що додавання до складу середовища сечовини зменшувало тривалість культивування до 40 год. Визначено раціональні параметри культивування: температура 27±1°C, перемішування при 120 об/хв, тривалість 40 год, аерація 1 м³/м³·хв.

3. Проаналізовано методи селекції промислових штамів-продуцентів серед базидієвих грибів та запропоновано схему отримання даного продуценту шляхом штучного добору.

4. Відповідно до визначених характеристик продукту, було запропоновано технологічну схему виробництва біомаси гриба, що враховує його особливості. Для реалізації описаного технологічного процесу визначене відповідне апаратурне оснащення для отримання біомаси в поліетиленових пакетах.

5. Проведено розрахунок матеріального балансу для серії продукту, що виготовляється за один виробничий цикл протягом стадій основного технологічного процесу та стадії пакування продукту. Показано, що з 6845 дм³ поживного середовища, враховуючи продуктивність штаму і втрати на відповідних стадіях, можна отримати 50 кг сухої біомаси запакованої в

					ДП 6210. 00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ВИСНОВКИ		
Розробив		Макогін О.О.					
Консульт.							
Керівник		Тітова Л.О.					
Затвер.					КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
					Стадія	Аркуш	Аркушів
					Д	77	86

поліетиленові пакети по 5 кг.

6. Обґрунтовано вибір конструкції ферментера об'ємом 10 м³ для виробничого біосинтезу, який обладнаний барботером та турбінною мішалкою. Технологічний та конструктивний розрахунки підтверджують надійність та працездатність ферментера.

					ДП 6210. 00. 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		78